

**Papel de la Galectina-3
en la degeneración valvular
en pacientes con
Estenosis Aórtica Severa**



Papel de la Galectina-3 en la degeneración valvular en pacientes con Estenosis Aórtica Severa

Memoria presentada por
Rafael Sádaba Sagredo
para optar al grado de Doctor por la
Universidad Pública de Navarra

Directora: Dra Natalia López Andrés

La Dra. Natalia López Andres,
investigadora principal del grupo
de Cardiología traslacional
de Navarrabiomed,

INFORMA

que la presente memoria de Tesis
Doctoral ***Papel de la Galectina-3
en la degeneración valvular en
pacientes con Estenosis Aórtica
Severa***, elaborada por don Rafael
Sádaba Sagredo, ha sido realizada
bajo su dirección y que cumple las
condiciones exigidas por la legislación
vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma la presente
en Pamplona, a 20 de diciembre
de 2018.

Fdo. Natalia López Andrés



Agradecimientos

El poder haber completado esta tesis hubiera sido imposible sin la ayuda y el apoyo de muchas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, a mi directora de tesis, Natalia López Andrés, por inspirarme, animarme y ayudarme a emprender y completar un trabajo que al principio se me antojaba demasiado difícil para mis capacidades. Me ha impresionado su conocimiento del tema, su paciencia y su saber hacer. Gracias a ella he podido profundizar y llegar a desarrollar un verdadero interés en la patología de la estenosis valvular aórtica, que va a condicionar de forma muy positiva mi desarrollo profesional como cirujano cardíaco.

A Ernesto Martínez Martínez, porque ha trabajado tanto en esta tesis, que sin su ayuda no la hubiera podido llevar a cabo. Ha sido un placer trabajar juntos y compartir muchos meses de ideas, sugerencias y colaboración. También a Amaya Fernández Celis por su trabajo en el laboratorio, siempre impecable y a tiempo y a Amaia Melero Lacasia por su ayuda en el reclutamiento de pacientes, en la organización del trabajo y por mantener la base de datos en orden. A Jaime Ibarrola y a Alicia Gainza, que aunque se incorporaron más tarde al grupo, también me han dedicado tiempo y ayuda en la preparación del texto.

A mi tutor Tomás Belzunegui Otano, por su apoyo, ánimo y ayuda, y por su disponibilidad permanente para atenderme.

A mis compañeros y compañeras del Área Clínica del Corazón, en particular a Virginia Álvarez Asían por su ayuda y empeño, casi mayor que el mío, en que completara la tesis, y por estar atenta y pendiente en el reclutamiento de pacientes. A Vanessa Arrieta Paniagua por su colaboración en la base de datos y a Fernando Olaz Preciado por su apoyo e interés incondicional en el trabajo realizado.

A mis compañeros cirujanos, Juan Luis Fernández Rodríguez, Ramón Sánchez Quintana, Luis Jiménez Alfaro, Félix Gómez Blasco y Javier De Diego Candela por su apoyo a las actividades investigadoras, y disponibilidad para enviar las muestras valvulares al laboratorio. Por supuesto también a las enfermeras de quirófano de Cirugía Cardíaca Eva Erro, María Cruz Gavari, María Bandrés y Leire Gonzalez por estar siempre atentas a que las muestras se enviaran al laboratorio.

A Ana, Miguel, Ignacio y Gabriela, por tanto apoyo y ánimo a su marido y padre durante muchos meses y comprender que además de sus horas de trabajo en el hospital, tenía que dedicar tiempo a su tesis durante las tardes y los fines de semana.

Índice

ABSTRACT —13—

INTRODUCCIÓN —29—

1. Las válvulas del corazón —31—
 - 1.1. Definición, estructura y función
 - 1.2. Enfermedades de las válvulas cardiacas
2. La válvula aórtica —33—
3. Enfermedades de la válvula aórtica —36—
 - 3.1. Insuficiencia aórtica
 - 3.2. Estenosis aórtica
 - 3.2.1. Fisiopatología de la EA
 - 3.2.2. Diagnóstico
 - 3.2.2.1. Exploración física
 - 3.2.2.2. Radiografía de tórax
 - 3.2.2.3. Ecocardiografía
 - 3.2.2.4. Cateterismo cardíaco
 - 3.2.2.5. Prueba de esfuerzo
 - 3.2.2.6. Tomografía computarizada multicorte
 - 3.2.2.7. Resonancia magnética cardiaca
 - 3.2.3. Historia natural y tratamiento
 - 3.2.4. Epidemiología
 - 3.3. Fisiopatogénesis de la estenosis aórtica degenerativa
 - 3.3.1. Infiltración lipídica
 - 3.3.2. Inflamación
 - 3.3.3. Sistema renina-angiotensina-aldosterona
 - 3.3.4. Mineralización de la matriz extracelular
4. Las células intersticiales de la válvula aórtica —50—
5. Biomarcadores en la EA —53—
6. La Galectina-3 —55—
 - 6.1. Estructura y función
 - 6.2. Expresión de gal-3 en el sistema cardiovascular
 - 6.3. Inhibición de Gal-3
 - 6.4. La Gal-3 en la EA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS —61—

MATERIALES Y MÉTODOS —65—

1. Estudio en una cohorte de pacientes con EA severa sintomática —67—
2. Análisis de las válvulas aórticas —68—
3. Análisis del suero de los pacientes —68—
4. Experimentos con CIVs aórticas humanas —68—
 - 4.1. Extracción y caracterización de las CIVs
 - 4.2. Tratamientos
 - 4.3. Cultivo de VICs en medio pro-osteogénico
 - 4.4. Silenciamiento de Gal-3 por edición genómica mediante CRISPR/Cas9
5. Modelo animal —70—
6. Técnicas de laboratorio empleadas —71—
 - 6.1. Análisis histológico
 - 6.2. ELISA
 - 6.3. PCR en tiempo real por transcripción reversa
 - 6.4. Western blot
 - 6.5. Estudios de actividad de metaloproteinasas
7. Análisis estadístico —77—

RESULTADOS —81—

1. Estudio de la cohorte de pacientes con EA —83—
 - 1.1. Características básicas de los pacientes con EA
 - 1.2. Niveles de Gal-3 y otros marcadores en los pacientes con EA
2. Análisis de las válvulas aórticas: estudio de la inflamación, el remodelado y la calcificación —85—
3. Gal-3 en las válvulas aórticas —88—
 - 3.1. Expresión de Gal-3 en las válvulas aórticas
 - 3.2. Localización de Gal-3 en la válvula aórtica
 - 3.3. Asociación de los niveles de Gal-3 en la válvula con otros parámetros
4. Estudio in vitro en CIVs —90—
 - 4.1. Tratamiento con Gal-3
 - 4.2. Inhibición farmacológica de Gal-3
 - 4.3. Inhibición de Gal-3 mediante CRISPR/Cas9
5. Estudio de la inhibición de Gal-3 en un modelo animal con EA —95—

DISCUSIÓN —100—

1. Consideraciones generales sobre el aumento de la Gal-3 en el tejido valvular aórtico de pacientes con EA y su asociación con sus niveles circulantes —101—
2. Efecto de la Gal-3 sobre las CIVs —103—
3. Inhibición farmacológica de la Gal-3 como posibilidad terapéutica de la EA —105—
4. Relevancia clínica y perspectivas del estudio —110—
5. Limitaciones —111—

CONCLUSIONES —113—

ABREVIATURAS —118—

BIBLIOGRAFÍA —122—

Abstract

INTRODUCTION

Aortic stenosis (AS) is the most common heart valve disease (43.1%) and represents a major healthcare burden (1). With the increase in the ageing population, there is a surge in the prevalence of calcific aortic valve (AV) disease. A prediction on the number of elderly patients (≥ 70 years) for the coming decades demonstrated that patients with severe AS will have increased 2,4 fold by the year 2040 and will be more than triple by the year 2060 (2). Patients with AS have an 80% risk of valve replacement, progression to heart failure (HF), or death in the next 5 years after diagnosis (3).

The pathophysiology underlying calcific aortic valve disease (CAVD) remains incompletely defined and there are currently no effective medical treatments capable of altering its course (4). Chronic inflammation, fibrosis and calcification play an important role in the progression of the disease (5). Therefore, it has been shown that CAVD shares features with vascular calcification and atherosclerosis such as chronic inflammation, increased extracellular matrix (ECM) remodelling, proliferation and differentiation of valvular interstitial cells (VICs) and the development of calcific lesions (6, 7). Of note, although retrospective studies had suggested that statins could delay the hemodynamic progression rate of AS (8, 9), randomized controlled studies reported in contrast, that a lipid-lowering strategy neither resulted in lower aortic valve-related events nor in a slower progression rate of stenosis (10, 11).

Galectin-3 (Gal-3) is a 29 to 35 kDa protein and member of a β -galactoside binding lectin family, which interacts with cell surface receptors and ECM proteins (12) {Ochieng, 2002, Extracellular functions of galectin-3}. Gal-3 levels are increased in patients with heart failure (HF) (13, 14) and in myocardial biopsies from AS patients with depressed ejection fraction (15). In addition, it has been demonstrated that patients with high Gal-3 plasma levels are associated with adverse outcome after trans-catheter aortic valve implantation suggesting that Gal-3 could play an important role in patients with AS (16). Gal-3 plays an important role in cardiac and vascular remodelling through its ability to stimulate ECM deposition as well as by amplification of key pro-inflammatory molecules (17, 18). Moreover, Gal-3 modulated vascular smooth muscle cells osteogenic differentiation, playing an important role in the development of atherosclerosis (19).

HYPOTHESIS

Our hypothesis is that Gal-3 could promote AV calcification, modulating VICs osteogenic differentiation. Furthermore, Gal-3 could be a new biotarget in

CAVD and its blockade could prevent AV calcification. We tested this hypothesis using human AVs samples, human VICs, and an animal model of AS rats treated with a specific inhibitor of Gal-3.

GENERAL AIMS

To characterize the role of Gal-3 in the calcific degeneration of the aortic valve in patients with severe aortic stenosis.

SPECIFIC AIMS

To evaluate the expression of Gal-3 and osteogenic markers in human stenotic aortic valves. To analyse the effect of Gal-3 and Gal-3 inhibition on the osteogenic differentiation of human VICs. To evaluate the effect of Gal-3 and Gal-3 inhibition on aortic valve calcification in a small animal model of aortic stenosis.

METHODS

PATIENT POPULATION

This prospective, observational study included a total of 77 consecutive patients with severe AS (aortic valve area $\leq 1 \text{ cm}^2$ (and/or) transaortic mean pressure gradient $>40 \text{ mmHg}$), referred to our centre for AV replacement from June 2013 to February 2015. Human AVs were obtained after surgery (AS, $n=77$). As controls, non-calcified human AVs were obtained at autopsy (Control, $n=11$) and were rapidly cut in two pieces. One piece was fixed in formol and embedded in paraffin and the other was frozen in liquid nitrogen.

AORTIC HUMAN VICs EXPERIMENTS

For the *in vitro* approach, we obtained the aortic VICs from 7 patients. For the experiments, we used at least VICs from 5 different patients. Aortic VICs were isolated using sequential collagenase digestion. Cells were treated with Gal-3 (10^{-8} M , R&D Systems) for 1-6 days to assess the effect of Gal-3 on inflammatory, fibrotic and calcification markers.

CRISPR/CAS9 GENOME EDITING MEDIATED DELETION OF GAL-3

The knockdown of Gal-3 in VICs was performed by CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindrome repeats) guided genome editing. Once Gal-3 knockdown was generated, VICs were cultured in osteogenic medium. At 7, 14 and 21 days cells extracts and supernatants were collected to evaluate inflammatory, fibrotic and calcification markers.

ANIMALS

Adult male Wistar rats were distributed in three different groups; Control rats (Control; n=7), rats with aortic stenosis (AS; n=7) and rats with AS receiving the Gal-3 inhibitor modified citrus pectin (AS+MCP; 100 mg/kg/day; n=7) in the drinking water. AS was performed by Harlan Laboratories as previously described according to the method used by several authors.(20) The ascending aorta was partially occluded by a hemoclip. In this model we modify the blood flow pattern across the aortic root by creating a supraaortic stenosis which alters the pattern of the forces which act upon the aortic surface of the aortic valve. Abnormal shear forces are known to induce the osteoblastic differentiation of VICs in calcific aortic stenosis (21). Treatment was initiated 1 day prior to AS and continued for another 6 weeks afterwards until the animals were finally sacrificed.

HISTOLOGICAL ANALYSIS

Tissue staining was performed on transversal sections of human and rat AV leaflets. All grossly calcified valves were decalcified in 10% formic acid solution for 24 hours. Samples were dehydrated, embedded in paraffin and cut in 5 µm-thick sections.

ELISA

Gal-3 was measured in serum samples by ELISA according to the manufacturer's instructions (BG Medicine). Interleukin-6 (IL-6) and interleukin 1 beta (IL-1β) concentrations were measured in valve extracts and cells supernatants by ELISA.

REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION PCR

Total RNA from AVs was extracted with Trizol Reagent (Euromedex) and purified using the RNeasy kit. First strand cDNA was synthesized according to the manufacturer's instructions (Roche). Quantitative PCR analysis was then performed with SYBR green PCR technology (ABGene). Relative quantification was achieved with MyiQ (Bio-Rad) software according to the manufacturer's instructions. Data were normalized by HPRT and β-actin levels and expressed as percentage relative to controls. All PCRs were performed at least in triplicate for each experimental condition.

WESTERN BLOT

Total proteins were prepared from either human valves homogenates or VICs extracts. Proteins were separated by SDS-PAGE on 10 % polyacrylamide gels and transferred to Hybond-c Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Membranes were probed with primary

antibodies for galectin-3, collagen I, collagen III, alpha-smooth muscle actin, Fibronectin, transforming growth factor β (TGF- β), BMP-2, BMP-4, Osteopontin, Runx2, Sox-9, TNF- α , cd68, cd45, cd80, and α -actin. Western Blots were performed with Stain Free gels for loading control. Signals were detected using the ECL system. Results are expressed as an n-fold increase over the values of the control group in densitometric arbitrary units.

GELATIN ZYMOGRAPHY

Aliquots of protein tissue samples or culture media containing 25 μ g human valves homogenates or 30 ml of supernatant respectively were resolved on a 10% SDS polyacrylamide gel containing 0.3% gelatin. The gel was rinsed three times for 15 min with a solution of 2.5% Triton X 100 to remove SDS and renature the proteins, followed by incubation for 48 h at 37°C in 1000 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5 with 1000 mmol/l CaCl_2 and 5000 mmol/l NaCl to promote degradation of gelatin. Gels were fixed in 40% methanol and 10% acetic acid, and then stained for 30 min in 0.25% Coomassie blue R-250 to identify proteolytic activity of metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2 and MMP-9.

STATISTICAL ANALYSIS

Continuous variables were expressed as mean \pm SD or median (25th to 75th percentile) and compared using unpaired T student test. Pearson's correlation coefficients were calculated to determine correlations. Categorical variables were expressed as percentages and compared using χ^2 -test. In the human study, we had more than 80% power with lesser than 5% error risk to find the significant differences observed (>0.95 SD).

In vitro data are expressed as mean \pm SEM. Normality of distributions was verified by means of the Kolmogorov–Smirnov test. Data were analysed using a one-way analysis of variance, followed by a Newman-Keuls to assess specific differences among groups or conditions.

All analysis was done with SPSS version 20.0 (IBM SPSS Statistics) and two-tailed p-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

BASELINE CHARACTERISTICS

In keeping with the typical characteristics of patients presenting with CAVD, mean age was 73 ± 8 years and 58% were male. A significant proportion suffered from concomitant coronary artery disease and hyperlipidaemia. Echocardiographic variables were those expected in patients with severe AS. BNP

levels indicated compensated disease. Gal-3 levels, inflammatory markers (CRP, IL-6, TNF- α), leukocyte activation markers (leukocyte number, myeloperoxidase, IL-8, L-selectin) and renal parameters (creatinine, GFR) are shown. Interestingly, serum Gal-3 levels positively correlated with serum TNF- α ($r=0.621$, $p<0.001$) and IL-6 ($r=0.521$, $p<0.001$) levels.

STENOTIC VALVES EXHIBIT HIGHER INFLAMMATION, ECM REMODELLING AND CALCIFICATION

An increase in ECM components was observed in AV from AS patients as compared to controls. Col1a1, Col3a1, α -SMA, TGF- β and CTGF mRNA levels were increased in AVs from AS patients. AV protein expressions of collagens (type I and type III), α -SMA, fibronectin and TGF- β were higher in AS patients than in controls. Furthermore, AS presented an increased in MMP-1, MMP-2 and MMP-9 mRNA levels accompanied by a decreased TIMP-1 mRNA levels without modifications in TIMP-2 levels. These results were confirmed by zymography showing an increase in MMP-1, MMP-2 and MMP-9 activities in AVs from AS patients.

Stenotic AVs exhibited higher expression of inflammatory markers at the mRNA levels in IL-6, CCL-2, TNF- α and an increase at protein levels of IL-6, IL-1 β TNF- α , cd68, cd45 as compared to controls without modifications in cd80 levels.

AVs from AS patients exhibited an increase in calcification markers such as BMP-2, BMP-4 and osteopontin mRNA levels as compared to controls. At the protein level, BMP-2, BMP-4, osteopontin, Runx2 and Sox-9 were up-regulated in AVs from AS patients as compared to controls.

AVS FROM AS PATIENTS PRESENTED HIGHER GAL-3 LEVELS ASSOCIATED WITH CALCIFICATION

Hematoxylin/Eosin staining was used to analyse the microstructure of the human AVs obtained from patients undergoing valve replacement for severe AS. Gal-3 was spontaneously expressed in the AVs from these patients.

There was a significant increase in Gal-3 mRNA and protein levels in AVs from AS patients as compare to controls. Strong and positive correlations were found between AV Gal-3 protein levels and serum Gal-3 levels.

Gal-3 in AVs was colocalized with the calcification markers BMP-2, Runx2 and Sox-9 and with inflammatory markers cd68, cd80 and TNF- α .

GAL-3 INDUCED PRO-INFLAMMATORY, PRO-FIBROTIC AND PRO-OSTEOGENIC RESPONSE IN HUMAN VICs

Inflammation, ECM components and calcification markers were studied in VICs treated with Gal-3 (10^{-8} M) for 1, 2, 3 and 6 days. Treatment with Gal-3 augmented IL-6 and IL-1 α secretion in VICs. Moreover, Gal-3 increased co-

llagen type I, TGF- β and fibronectin protein expressions in a time-dependent manner. As shown in Figure 3B, Gal-3 enhanced the expression of the calcification markers BMP-2, BMP-4 and SOX-9 in a time-dependent manner, reaching the peak for the factors at 6 days of treatment without modification of Runx2 levels.

We studied the effects of the Gal-3 inhibitor MCP, in VICs cultured in osteogenic medium at different days (7, 14 and 21 days). The presence of MCP in the medium was able to diminish IL-6 and IL-1 α secretion as well as Gal-3 protein levels at all of days studied. This decrease in Gal-3 was accompanied by a decrease in fibronectin protein levels at 21 days of treatment with MCP. In addition, VICs treated with MCP presented a decrease in calcification markers in a time dependent manner. MCP decreased BMP-2 protein levels at 14 and 21 days of treatment and BMP-4, SOX-9 and Runx2 protein levels at 21 days.

In another set of experiments, to confirm the consequences of Gal-3 inhibition on VICs osteogenic differentiation, Gal-3 knockout VICs were generated using CRISPR/Cas9 technology. As compared to scramble, Gal-3 knockout VICs presented lower levels of IL-6 and IL-1 α secretion as well and diminished expression of Gal-3 and fibronectin protein levels at all of days studied. Moreover, BMP-2, BMP-4, SOX-9 and Runx2 expressions were lower in Gal-3 knockout VICs at 7, 14 and 21 days of osteogenic differentiation.

GAL-3 INHIBITION DECREASES AV CALCIFICATION IN RATS

Hematoxylin/Eosin staining was used to analyze the microstructure of the AVs obtained from Control, AS and AS+MCP rats. As shown in the microphotographs, AV from AS rats exhibited increased AV areas as compared to Controls and AS+MCP rats. Gal-3 expression was increased in AVs from AS rats as compared to controls, and normalized by MCP treatment. The expression of the calcification markers BMP-2 and SOX-9 was significantly higher in AVs from AS rats as compared to controls. The immunostaining for BMP-4, Runx2 and cd68 tended to be higher in AVs from AS rats. MCP treatment diminished the expression of all the calcification and inflammatory markers analysed.

DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the role of Gal-3 in AV calcification in patients with severe CAVD. Our results demonstrate that Gal-3 is increased in stenotic AV tissue and correlates with its serum levels. Moreover, Gal-3 is colocalized with markers of calcification and inflammation in stenotic AVs, suggesting that it plays a role in these processes. In aortic VICs *in vitro*, Gal-3

increases inflammatory, fibrotic and calcification markers. The Gal-3 inhibitor MCP as well as Gal-3 silencing delays AV calcification in aortic VICs. Moreover, *in vivo*, Gal-3 blockade in an AS model exerted beneficial effects, diminishing AV calcification. Taken together, these findings reveal a role for Gal-3 in AV calcification associated with AS progression.

The AV leaflets are a highly specialized structure consisting mostly of VICs and complex ECM structures (6, 22). An inflammatory and fibrotic process in AV in humans and animal models has been previously reported (23-25). Aberrant remodelling of the ECM is also brought about by the deregulated expression of MMPs, facilitating inflammation (26). These events are associated with activation of VICs towards an osteogenic-like phenotype associated with up-regulation of BMPs pathway (27). In agreement with these data, AS patients presented an increase in inflammation, ECM remodeling, MMP activities, and calcification markers. All these processes are accompanied by enhanced Gal-3 levels in serum and AVs from AS patients. In addition, AV Gal-3 protein levels and serum Gal-3 levels were correlated, suggesting that circulating Gal-3 levels could indicate AV calcification in AS. Moreover, Gal-3 colocalized with expression of VICs markers, as well as with osteogenic and inflammatory markers, proposing a role for this lectin in the calcification and inflammatory processes associated with AS progression. Accordingly, Gal-3 enhanced inflammatory, fibrotic, and osteogenic markers in VICs by activating the ERK1/2 pathway. The ERK1/2 pathway plays an important role in regulating the calcification of VICs (28). Similarly, in human cardiac fibroblasts, Gal-3 showed proinflammatory and profibrotic properties increasing inflammatory markers, MMPs activity and ECM components (29). Importantly, and in line with our findings, Gal-3 has been shown to promote vascular calcification associated with atherosclerosis (19). When cultured in an osteogenic medium, Gal-3-deficient vascular smooth muscle cells (VSMCs) exhibited defective osteogenic differentiation (19), suggesting that Gal-3 was essential for a complete transdifferentiation of VSMCs into osteoblast-like cells. In fact, Gal-3 has also been related with Runx2 (30), and to participate in the process of endochondral bone formation (31).

CAVD share features with vascular calcification and atherosclerosis (6). However, statins therapy did not reduce the progression of AS (10, 11). In addition, AS patients present left ventricle (LV) remodeling in response to chronically increased afterload. Because of this fact, angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEis) could promote beneficial effects in AS patients (32). In the RIAS study, ACE inhibition leads to a modest reduction in LV mass in asymptomatic patients with AS, with trends toward slower progression of valvular stenosis (33). Although the data of the RIAS study are promising,

routine use of ACEis in patients with asymptomatic AS cannot be systematically recommended at this time. Importantly, circulating Gal-3 levels positively correlated with cardiac fibrosis in AS patients (34). Moreover, Gal-3 may serve as a prognostic biomarker after transcatheter AV implantation by reflecting the degree of myocardial fibrosis (16). Additionally, cardiac Gal-3 expression is associated with inflammatory markers in myocardial biopsies from AS patients (7). However, a recent study concludes that Gal-3 did not provide prognostic information on the occurrence of AS-related events (35).

Previous studies in our group have demonstrated that pharmacological Gal-3 inhibition using MCP prevented cardiovascular remodelling in several hypertensive models (17, 18, 29) as well as in a normotensive model of obesity (36). Similar beneficial effects of Gal-3 inhibition have been reported on cardiac fibrosis, remodelling and dysfunction in angiotensin II-treated animals (37). Our results have shown that Gal-3 not only acts on ECM components and inflammation, but also in calcification process. *In vitro*, in human VICs, Gal-3 inhibition with MCP attenuated the pro-inflammatory, pro-fibrotic and pro-osteogenic response. Complementary, Gal-3-deficient VICs presented lower inflammation and osteogenic differentiation, indicating that Gal-3 may play a role as a downstream mediator in the regulation of calcification. These pro-osteogenic effects of Gal-3 were confirmed in an animal model of AS, where the treatment with the pharmacological inhibitor of Gal-3 was able to decrease the AV calcification in the AS group showing the potential therapeutic benefit of Gal-3 inhibition with MCP.

The present study demonstrates that Gal-3 is elevated in aortic VICs of stenotic valves. Enhanced Gal-3 activation plays an important role in the augmentation of the pro-inflammatory, pro-fibrotic and pro-osteogenic response. Furthermore, Gal-3 blockade delays AV calcification. These novel findings obtained in diseased AVs, in human aortic VICs and in an experimental model of AS indicate that Gal-3 may be a new potential biotarget for delaying AV calcification and for the prevention of CAVD.

REFERENCES

1. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Barwolf C, Levang OW, et al. *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease*. Eur Heart J. 2003;24(13):1231-43.
2. Danielsen R, Aspelund T, Harris TB, Gudnason V. *The prevalence of aortic stenosis in the elderly in Iceland and predictions for the coming decades: the AGES-Reykjavik study*. Int J Cardiol. 2014;176(3):916-22.
3. Otto CM, Burwash IG, Legget ME, Munt BI, Fujioka M, Healy NL, et al. *Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome*. Circulation. 1997;95(9):2262-70.
4. Bosse Y, Miqdad A, Fournier D, Pepin A, Pibarot P, Mathieu P. *Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves*. Circ Cardiovasc Genet. 2009;2(5):489-98.
5. Mohler ER, 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. *Bone formation and inflammation in cardiac valves*. Circulation. 2001;103(11):1522-8.
6. Back M, Gasser TC, Michel JB, Caligiuri G. *Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases*. Cardiovasc Res. 2013;99(2):232-41.
7. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. *Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium*. J Am Coll Cardiol. 2012;60(19):1854-63.
8. Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, Sebo TC, Niekrasz M, McConnell JP, et al. *Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve*. Circulation. 2002;105(22):2660-5.
9. Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, Stone NJ, Springett M, Ignatiev KI, et al. *Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve*. Heart. 2005;91(6):806-10.
10. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J. *Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial*. Circulation. 2010;121(2):306-14.

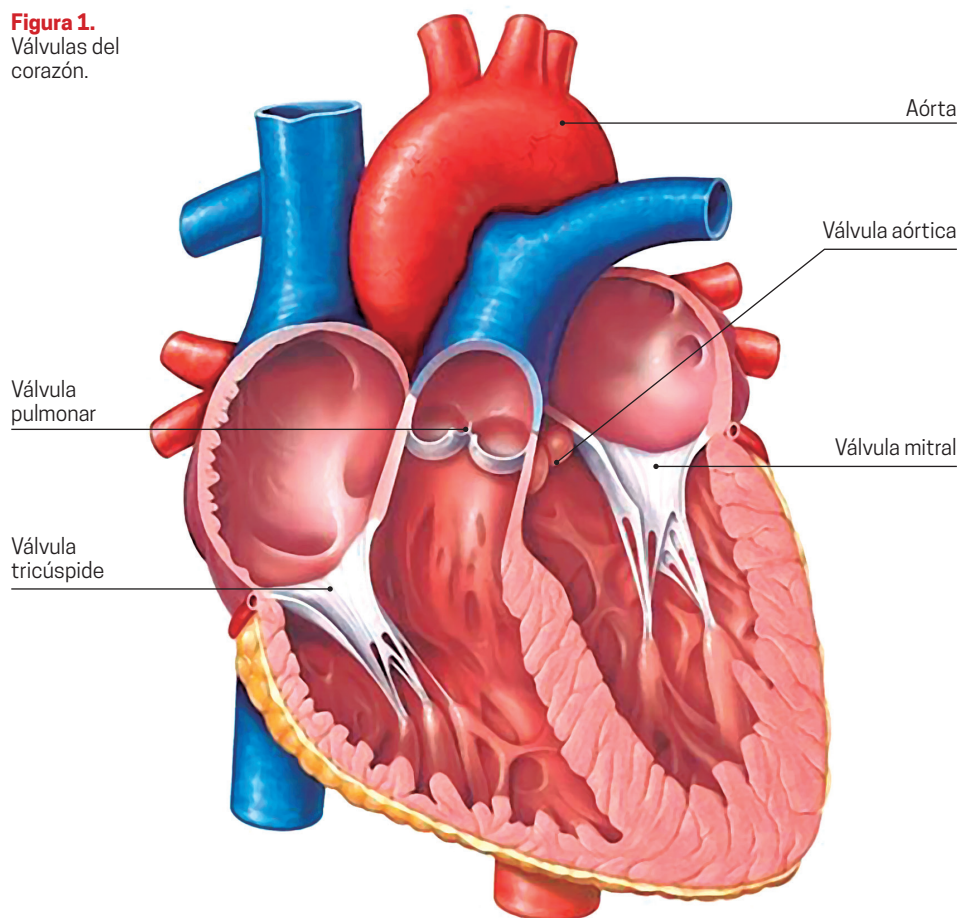
11. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, et al. *A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis*. N Engl J Med. 2005;352(23):2389-97.
12. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. *Extracellular functions of galectin-3*. Glycoconj J. 2002;19(7-9):527-35.
13. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Jr., Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, et al. *Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure*. J Am Coll Cardiol. 2006;48(6):1217-24.
14. Lopez-Andres N, Rossignol P, Iraqi W, Fay R, Nuee J, Ghio S, et al. *Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial*. Eur J Heart Fail. 2012;14(1):74-81.
15. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. *Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction*. Circulation. 2004;110(19):3121-8.
16. Baldenhofer G, Zhang K, Spethmann S, Laule M, Eilers B, Leonhardt F, et al. *Galectin-3 predicts short- and long-term outcome in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation (TAVI)*. Int J Cardiol. 2014;177(3):912-7.
17. Calvier L, Martinez-Martinez E, Miana M, Cachofeiro V, Rousseau E, Sadaba JR, et al. *The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-induced cardiac and renal injuries*. JACC Heart Fail. 2015;3(1):59-67.
18. Calvier L, Miana M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, de Boer RA, et al. *Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(1):67-75.
19. Menini S, Iacobini C, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Salvi L, Pesce CM, et al. *The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis*. Cardiovasc Res. 2013;100(3):472-80.
20. Foltz WU, Wagner M, Rudakova E, Volk T. *N-acetylcysteine prevents electrical remodeling and attenuates cellular hypertrophy in epicardial myocytes of rats with ascending aortic stenosis*. Basic Res Cardiol. 2012;107(5):290.
21. Gould ST, Srigunapalan S, Simmons CA, Anseth KS. *Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease*. Circ Res. 2013;113(2):186-97.

22. Merryman WD, Youn I, Lukoff HD, Krueger PM, Guilak F, Hopkins RA, et al. *Correlation between heart valve interstitial cell stiffness and transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;290(1):H224-31.
23. Towler DA. *Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease*. Circ Res. 2013;113(2):198-208.
24. Chakraborty S, Wirrig EE, Hinton RB, Merrill WH, Spicer DB, Yutzey KE. *Twist1 promotes heart valve cell proliferation and extracellular matrix gene expression during development in vivo and is expressed in human diseased aortic valves*. Dev Biol. 2010;347(1):167-79.
25. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Brooks RM, 2nd, Berry CJ, Zimmerman K, et al. *Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice*. Circulation. 2009;119(20):2693-701.
26. Vanhoutte D, van Almen GC, Van Aelst LN, Van Cleemput J, Droogne W, Jin Y, et al. *Matricellular proteins and matrix metalloproteinases mark the inflammatory and fibrotic response in human cardiac allograft rejection*. Eur Heart J. 2013;34(25):1930-41.
27. Poggio P, Sainger R, Branchetti E, Grau JB, Lai EK, Gorman RC, et al. *Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis*. Cardiovasc Res. 2013;98(3):402-10.
28. Gu X, Masters KS. *Role of the MAPK/ERK pathway in valvular interstitial cell calcification*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296(6):H1748-57.
29. Martinez-Martinez E, Calvier L, Fernandez-Celis A, Rousseau E, Jurado-Lopez R, Rossoni LV, et al. *Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension*. Hypertension. 2015;66(4):767-75.
30. Stock M, Schafer H, Stricker S, Gross G, Mundlos S, Otto F. *Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2*. J Biol Chem. 2003;278(19):17360-7.
31. Colnot C, Sidhu SS, Poirier F, Balmain N. *Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1999;45(8):1191-202.
32. Davin L, Dulgheru R, Lancellotti P. *ACE inhibitors in aortic stenosis: no fear just hope*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 16. England2015. p. 828-30.

33. Bull S, Loudon M, Francis JM, Joseph J, Gerry S, Karamitsos TD, et al. *A prospective, double-blind, randomized controlled trial of the angiotensin-converting enzyme inhibitor Ramipril In Aortic Stenosis (RIAS trial)*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2015;16(8):834-41.
34. Zhou K, Zhou Y, Zhao Y, Tan C, Yuan Z, Li J, et al. *The Relationship between Galectin-3 and Different Patterns of Ventricular Geometry Remodelling in Aortic Valve Stenosis*. Heart Lung Circ. 2016;25(4):371-7.
35. Arangalage D, Nguyen V, Robert T, Melissopoulou M, Mathieu T, Estellat C, et al. *Determinants and prognostic value of Galectin-3 in patients with aortic valve stenosis*. Heart. 2016;102(11):862-8.
36. Martinez-Martinez E, Jurado-Lopez R, Valero-Munoz M, Bartolome MV, Ballesteros S, Luaces M, et al. *Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: potential role in obesity*. J Hypertens. 2014;32(5):1104-14; discussion 14.
37. Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, Bos EM, van Goor H, Sanjabi B, et al. *Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis*. Circ Heart Fail. 2013;6(1):107-17.

Introducción

Figura 1.
Válvulas del
corazón.



1. LAS VÁLVULAS DEL CORAZÓN

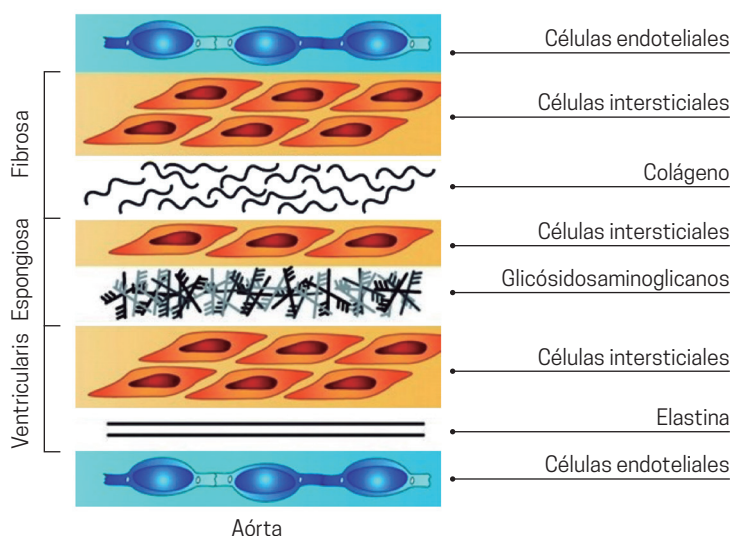
1.1. DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La misión del corazón es recibir la sangre del organismo y enviarla a los pulmones, donde se oxigena, para volver de nuevo con un flujo adecuado a las necesidades de todos sus tejidos y estructuras. Las cámaras del corazón son cuatro: dos aurículas y dos ventrículos; las cámaras derechas están separadas de las izquierdas por el tabique interauricular y el interventricular, respectivamente. Los ventrículos son las bombas más activas y de ellos depende principalmente el funcionamiento del corazón. Las aurículas contribuyen al llenado de los ventrículos con su contracción y, en condiciones normales, representan el 20% del volumen de llenado. Las válvulas son puertas que existen entre las diferentes cámaras y que obligan a la sangre a seguir una dirección para que no retroceda una vez que entra el flujo sanguíneo en el corazón (*Figura 1*).

La válvula tricúspide está situada entre la aurícula derecha y el ventrículo derecho; la válvula pulmonar, entre el ventrículo derecho y la arteria pulmonar; la válvula mitral se encuentra entre la aurícula izquierda (AI) y el ventrículo izquierdo; y la válvula aórtica (VA), entre el ventrículo izquierdo y la aorta. Las dos válvulas situadas en el lado derecho del corazón (tricúspide y pulmonar) dirigen la sangre que entra procedente del organismo hacia el pulmón, donde se oxigena; desde allí retorna a la aurícula izquierda, para pasar después a través de las válvulas mitral y aórtica, que ordenan a la sangre seguir la dirección hacia el organismo a fin de llevarle oxígeno y nutrientes. Las cuatro válvulas cardíacas comparten una estructura arquitectónica en láminas compuesta por células, como las células endoteliales valvulares (CEVs) en las superficies que están en contacto con la sangre y las células intersticiales valvulares (CIVs) a nivel más profundo, y la matriz extracelular (MEC) valvular que contiene colágeno, elastina y MEC amorfa (predominantemente glicósidoaminoglicanos). A nivel histológico, las válvulas constan de tres capas: la fibrosa, que es una lámina de colágeno densa, próxima a la superficie de entrada de la sangre, que se continua con las estructuras que dan soporte a la válvula; la esponjosa, que es una lámina central de tejido conectivo laxo rico en glicósidoaminoglicanos; y la ventricularis, que es una lámina rica en elastina y próxima a la superficie de salida de la sangre (*Figura 2*). (1)

Aunque las válvulas cardíacas son relativamente avasculares en estado fisiológico, se han identificado terminaciones nerviosas que contienen neurotransmisores simpáticos, parasimpáticos y peptidomiméticos activos. (2)

Figura 2.
Estructura
arquitectónica
de la válvula
aórtica
(modificada
de 1).



1.2 ENFERMEDADES DE LAS VÁLVULAS CARDIACAS

La inflamación, el engrosamiento, la rigidez, la rotura, la mala coaptación y la calcificación de las valvas determinan que el orificio o área valvular disminuya y/o que su cierre sea incompleto. En el primer caso, la disminución de su orificio efectivo (estenosis) impide el paso de la sangre de una cámara a otra; en el segundo, la incompetencia al cerrarse (insuficiencia valvular) hace que la sangre vuelva a la cámara de donde procede. En cualquiera de las dos situaciones, se van a producir dos fenómenos. En primer lugar, el flujo de sangre anterógrado hacia el organismo disminuye, por lo que no cumple la misión de aportar oxígeno y nutrientes a las células. En segundo lugar, la sangre se retiene aguas atrás y, dependiendo de la válvula afectada, ocasiona síntomas de congestión pulmonar, hepática o de los miembros inferiores. La severidad de estas lesiones tiende a aumentar con el paso del tiempo al calcificarse o retraerse los velos, y la válvula va perdiendo progresivamente su integridad funcional y anatómica. Pero quizá lo más importante que acontece es el deterioro progresivo que ocasionan esas lesiones valvulares en las cámaras próximas a la válvula afectada, así como a los ventrículos, auténticas bombas musculares que se dilatan excesivamente y pueden llegar a perder su función, a veces de forma irreversible. Esto sucede en las insuficiencias valvulares. A veces puede producirse sin síntomas, hecho que entraña un riesgo importante y que empeora la historia natural de esta enfermedad. La dilatación y la pérdida de función de las aurículas, fundamentalmente en las lesiones mitrales, determinan la aparición de trastornos del ritmo (arritmia).

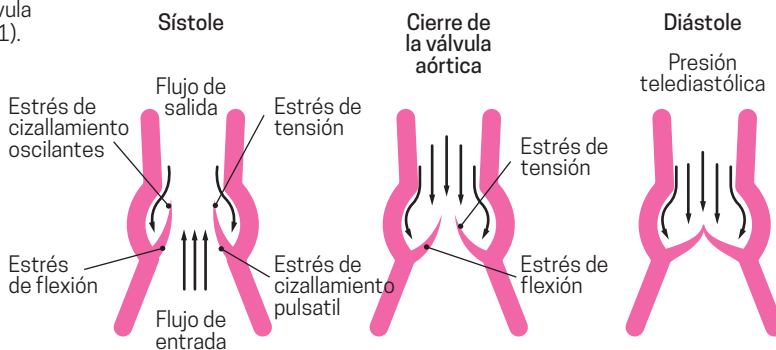
2. LA VÁLVULA AÓRTICA

La VA está situada anatómicamente entre el ventrículo izquierdo (VI) y la aorta, y es el orificio por el cual se expulsa la sangre desde el corazón al torrente circulatorio. En un corazón normal, la sangre fluye siempre desde el ventrículo a la aorta, pero no en sentido contrario. Esto implica, por un lado, que cuando el corazón se contrae para eyectar la sangre (sístole), la válvula aórtica debe abrirse para permitir que la sangre salga y por otro, que cuando esta contracción cesa y el ventrículo se relaja (diástole), la válvula debe cerrarse para que la sangre no vuelva atrás.

La VA humana es una estructura única. Para los 80 años de edad, se habrá abierto y cerrado unos 3000 millones de veces, soportando la mayor presión del sistema cardiovascular. Igualmente tiene la habilidad de regular un flujo de sangre de entre 1 y 20 litros de sangre por minuto a través de ella dependiendo del estado hemodinámico del sistema cardiovascular.

La VA representa un paradigma de la especialización de la estructura valvular y de la dinámica tisular. La dirección del flujo sanguíneo durante la sístole permite que la válvula se abra al pasar la sangre entre los velos aórticos. La superficie de entrada de este flujo se localiza a lo largo de la dirección del mismo. Durante la diástole, la válvula se cierra debido a que la presión fin de diástole hace que se cierren los velos a lo largo de la superficie de salida. Como se explicará más abajo, los velos de la VA se unen a la pared aórtica en forma semilunar, ascendiendo hasta las comisuras y descendiendo hasta la unión basal de cada velo. Durante la fase de cierre (diástole) y bajo la presión de la sangre en la aorta, los velos de la VA se estiran y coaptan, cerrando así el orificio (*Figura 3*).

Figura 3.
Fuerzas hemodinámicas y flujos a través de la válvula aórtica (1).

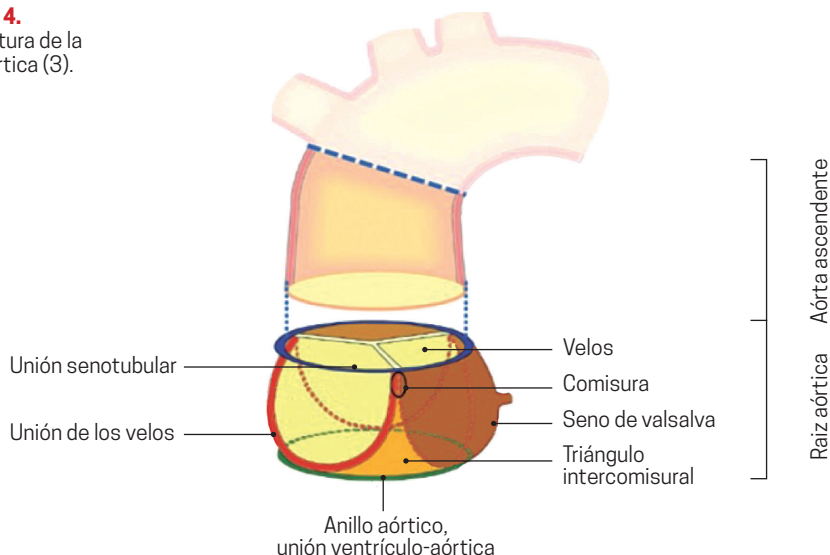


Desde un punto de vista funcional, la VA no se entiende sin tener en cuenta también el tracto de salida del ventrículo izquierdo (TSVI) y la raíz aórtica.

El TSVI consiste en una estructura fibromuscular en la que septo interventricular muscular y membranoso forman la cara anterior y la cortina mitroaórtica y el velo anterior de la válvula mitral forman la cara posterior. Las caras anterior y posterior se unen en los trígonos fibrosos derecho e izquierdo, que actúan como bisagras, y por lo tanto juegan un papel importante en el mantenimiento del comportamiento hemodinámico del TSVI.

La raíz aórtica provee las estructuras de soporte para los velos de la VA y forma un puente entre el ventrículo izquierdo y la aorta ascendente. La raíz aórtica se extiende desde la unión basal de los velos que se encuentra en el interior del ventrículo izquierdo, hasta la unión sinotubular. La unión ventrículo-aórtica anatómica que es circular y está dentro de la raíz aórtica, se encuentra en el punto donde las estructuras de soporte del TSVI dan lugar a las paredes fibro-elásticas de los senos valvulares aórticos (senos de Valsalva). Este anillo es, sin embargo, discordante con la morfología de la línea de inserción de los velos de la VA, ya que se cruza en varios puntos con esta. Esta línea de estructura semilunar o de corona, se extiende a través de la raíz, desde la unión basal de los velos, dentro del ventrículo izquierdo, hasta la unión más distal en la unión sinotubular y conforma lo que se conoce como el anillo de la válvula aórtica. Las crestas de este anillo, a la altura de la unión sinotubular, dan lugar a las “comisuras” o zonas de unión de cada velo valvular con su contiguo, de tal forma que normalmente se distinguen 3 comisuras. Las comisuras tienen una estructura fibrosa y sostienen a los velos valvulares (*Figura 4*).

Figura 4.
Estructura de la
raíz aórtica (3).



Las uniones semilunares de los velos dentro de los senos de Valsalva son las que forman la unión hemodinámica entre el ventrículo izquierdo y la aorta, y conforman un triángulo que tiene como base la unión ventrículo-aórtica. Todas las estructuras distales a estas uniones están sujetas a presiones arteriales, mientras que las proximales están sujetas a presiones ventriculares. Desde un punto de vista funcional, los tres senos valvulares y sus correspondientes velos son idénticos. Sin embargo, desde un punto anatómico, son diferentes, ya que dos de los senos dan lugar a las arterias coronarias (derecha e izquierda). Estos dos senos, en su mayor parte están formados por pared aórtica, pero debido a que las uniones semilunares cruzan la unión ventrículo-aórtica anatómica, una banda de músculo ventricular se incorpora a la base de ambos senos. El tercer seno (llamado no-coronariano) no tiene banda muscular, y por tanto solo tiene pared fibrosa. La base de este seno por debajo de la unión ventrículo-aórtica anatómica forma parte de la continuidad de las válvulas aórtica y mitral, que como ya se ha descrito anteriormente conforma la cara posterior del TSVI (3).

Válvula aórtica bicúspide

Aunque generalmente la válvula aórtica tiene tres velos, existe una variante conocida como válvula aórtica bicúspide (VAB), en la que solo existen dos velos. La VAB es la anomalía congénita cardíaca más frecuente, teniendo una prevalencia en la población general de un 0.9 al 2% y aparece con una frecuencia del 54% en todos los pacientes mayores de 15 años con estenosis aórtica (EA) severa. La EA es la complicación más frecuente de la VAB. Las VABs se forman como resultado de una formación anormal de los velos durante la valvulogénesis. Los velos adyacentes se unen para formar un único velo aberrante, que es de mayor tamaño que el otro, pero más pequeño que 2 velos normales juntos. El mayor de los dos velos suele tener un rafe o falsa comisura, que histológicamente carece de tejido valvular propiamente dicho. Los velos suelen estar orientados a la derecha y la izquierda, con las comisuras verdaderas en una orientación anterior-posterior. Probablemente las VABs son resultado del complejo proceso de desarrollo valvular, más que de una simple fusión de dos velos normales. En realidad, las malformaciones congénitas de la VA parecen ser el resultado de un continuum fenotípico de válvulas monocúspides (forma más severa), válvulas bicúspides (forma moderada), válvulas tricúspides (normal) y las más raras válvulas quatricúspides. Las VABs pueden tener una distribución familiar con un patrón hereditario multifactorial, o de forma ocasional, con un patrón autosómico dominante. Se ha descrito que en familiares de primer grado de individuos con VAB, la prevalencia de este defecto es del 9.1%, mucho más alto que la prevalencia en la población

general. Curiosamente, aunque las VABs son más frecuentes en varones que en mujeres por un factor de 2 a 1 en la población general, la prevalencia es similar en aquellas familias con más de un individuo afectado (4) (5).

3. ENFERMEDADES DE LA VÁLVULA AÓRTICA

Las alternaciones hemodinámicas de la VA se pueden dividir en dos grandes grupos, la insuficiencia aórtica (IA) y la EA.

3.1. INSUFICIENCIA AÓRTICA

La IA se caracteriza por el reflujo diastólico de sangre desde la aorta al VI debido a la falta de coaptación de los velos aórticos. El reflujo diastólico de sangre desde la aorta al VI provoca una sobrecarga de volumen en el mismo. La sobrecarga de volumen es consecuencia del propio volumen de sangre que vuelve al VI y, por tanto, está directamente relacionada con el tamaño de este volumen y también con la gravedad de la insuficiencia. De esta forma, mientras que la IA ligera produce solamente una sobrecarga de volumen mínima, la IA grave produce una sobrecarga de volumen masiva y la dilatación progresiva de la cavidad ventricular izquierda.

Durante la fase inicial de la IA compensada, el VI se adapta a la sobrecarga de volumen por medio de una hipertrofia excéntrica, ya que se produce un aumento compensatorio del tamaño de los miocitos y un aumento del volumen ventricular. El aumento de tamaño de los miocitos se desencadena a través de la activación, por estímulos externos, de diferentes señales intracelulares. Éstas actúan sobre el núcleo, favorecen una mayor síntesis de proteínas y producen una reduplicación de sarcómeros (6). La hipertrofia excéntrica mantiene la elasticidad diastólica del VI, de tal forma que la presión de llenado del VI permanece normal o ligeramente aumentada, a pesar de tener que soportar el volumen extra de sangre regurgitante. Aparte de ello, la hipertrofia excéntrica aumenta la masa ventricular izquierda, de tal forma que la relación volumen/masa permanece inalterada y la fracción de eyección del VI (FEVI) se mantiene por el aumento de la precarga (7).

En la IA también se produce una sobrecarga de presión, resultante de la hipertensión sistólica que ocurre como consecuencia del aumento del volumen de eyección aórtico, ya que tanto el volumen retrógrado como el anterógrado son eyectados hacia la aorta en sístole. Esta hipertensión sistólica puede contribuir a un proceso de dilatación de la raíz aórtica y a un consecuente aumento de la IA (7). El remodelado de la matriz extracelular en la hipertrofia por

sobrecarga de volumen parece ser diferente a la causada por sobrecarga de presión. En situaciones de sobrecarga de volumen, la dilatación de la cavidad ventricular se debe tanto al aumento de tamaño de los miocitos, como a los cambios en el tramado de las fibras de colágeno. La disolución de este tramado conduce a un aumento de la elasticidad, a una disminución de las fibras musculares y a un incremento en el tamaño de la cavidad. Esta disolución se debe fundamentalmente a la activación de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), una familia de proteínas que contienen zinc y que incluye estromelisin, colagenasas, gelatinasas y MMPs de membrana (8).

Con el paso del tiempo, la dilatación progresiva del VI y la hipertensión sistólica aumentan la tensión parietal y la relación volumen/masa ventricular. Conforme esto ocurre, hay una fase durante la que la FEVI permanece dentro de la normalidad, pero sin embargo la elasticidad del ventrículo decrece, lo que conduce a una disfunción miocárdica inicial que está en gran parte encubierta por el aumento en la precarga. Estos hechos representan una fase reversible del proceso si se procede a una sustitución valvular aórtica. En caso contrario, el aumento en la tensión parietal conduce a una disfunción sistólica del VI más acusada. En la IA grave crónica, la tensión parietal al final de sístole puede llegar a ser tan alta como en la EA, lo que da lugar a una marcada hipertrofia del VI (cor bovinum) con un aumento del volumen y la masa del VI y la adopción de una geometría esférica. En la IA grave descompensada, a la disfunción sistólica del VI se asocia una disminución de la elasticidad del mismo. Esto produce un aumento de las presiones de llenado y la aparición de síntomas de insuficiencia cardíaca. (7)

La fisiopatología de la IA grave aguda difiere sustancialmente de la crónica, ya que impone un repentino exceso de carga de volumen sobre un VI no preparado para esta situación. Esto resulta en un drástico incremento de la presión telediastólica en el ventrículo izquierdo (PTDVI) que puede llegar a igualar a la presión diastólica en la aorta. Debido a que la presión en el VI es superior a la presión en la aurícula izquierda durante la diástole, se crea un gradiente ventriculoauricular que produce un cierre prematuro de la válvula mitral previo al comienzo de la siguiente sístole. Este cierre prematuro de la válvula mitral es beneficioso porque impide que la alta PTDVI se transmita al sistema venoso pulmonar, evitando así el edema pulmonar y el fallo cardíaco izquierdo. No obstante, esta protección que ofrece el cierre prematuro de la válvula mitral se pierde cuando el gradiente ventriculoauricular sigue aumentando y hace que la válvula mitral se abra al final de la diástole, dando lugar a una insuficiencia mitral diastólica. (9).

La IA es una valvulopatía de curso muy silente y en ocasiones se diagnostica de forma casual. El síntoma predominante es la disnea de esfuerzo que

progresa a disnea de reposo, disnea paroxística nocturna, ortopnea y datos de insuficiencia cardíaca derecha. En fases más avanzadas de la enfermedad se asocian síntomas de bajo gasto como fatigabilidad y debilidad muscular. La presencia de angina es otro síntoma y se debe a una disminución de la presión de perfusión coronaria. En el caso de que se produzca una IA aguda, esta se presenta como datos de fallo cardíaco agudo anterógrado y retrógrado: bajo gasto asociado a edema agudo de pulmón.

3.2. ESTENOSIS AÓRTICA

3.2.1. FISIOPATOLOGÍA

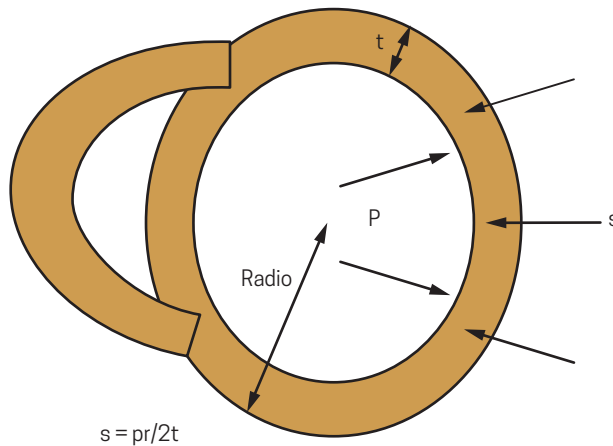
En situaciones normales, la VA ofrece poca o nula resistencia al flujo anterógrado de sangre desde el VI a la aorta. Cuando la válvula está abierta, las presiones a ambos lados de la misma son prácticamente iguales. Este equilibrio entre la presión sistólica en el ventrículo izquierdo y en la aorta se mantiene hasta que el área de la VA disminuye por debajo de la mitad de su superficie normal de 3-4 cm². Conforme la EA avanza, se va generando un gradiente de presión entre el VI y la aorta. Este gradiente representa la presión adicional (sobrecarga) que el ventrículo izquierdo tiene que superar para poder eyectar sangre a través de la válvula estenosada.

En la EA la sobrecarga de presión provoca una hipertrofia ventricular izquierda (HVI) concéntrica a través de una cascada de acontecimientos biológicos, como por ejemplo un aumento en la síntesis de la cadena pesada de la miosina, que se acompañan de unos complejos cambios en la reprogramación de los genes que incluyen la re-expresión de genes cardíacos fetales inmaduros. La disminución gradual del área valvular aórtica produce, en consecuencia, un aumento progresivo de la presión y de la HVI. En situaciones de sobrecarga de presión, y como adaptación a la misma, se produce también un aumento en la producción y deposición intersticial de colágeno, que debe diferenciarse de la deposición patológica de colágeno, la cual se caracteriza por la presencia de fibrosis tanto intersticial como perivascular. El origen de la fibrosis reactiva en la EA no está completamente aclarado. Entre las posibles causas se describen una alteración en la interacción entre los miocitos y la MEC, la isquemia miocárdica o la activación local de péptidos tróficos como la angiotensina II, la aldosterona y/o las catecolaminas, que dan lugar a una expresión secuencial del factor de crecimiento transformador β_1 (TGF- β_1) y de la fibronectina, y consecuentemente a un relativo aumento en la deposición de colágeno. La sobrecarga de presión por sí sola aumenta la poscarga ventricular izquierda, empeorando la FEVI. La poscarga generalmente se cuantifica como la tensión parietal o el estrés de la pared (s), que se rige por la

ley de Laplace, en la que $s = pr/2t$, donde p es la presión ventricular izquierda, r es el radio ventricular y t es el grosor ventricular. Cuando la presión crece en el numerador de la ecuación, se compensa por un aumento en el grosor de la pared (hipertrofia concéntrica VI en el denominador, manteniendo la poscarga normal. La normalización de la poscarga es fundamental para mantener la FEVI y el volumen sistólico(10). (Figura 5)

La HVI tiene dos consecuencias hemodinámicas. En primer lugar, se ha demostrado que disminuye la contractilidad ventricular. En segundo lugar, conduce a un patrón de flujo coronario anómalo y a una disminución de la reserva de flujo coronario, que conduce a un estado de isquemia miocárdica relativa. En concreto, se ha identificado un patrón consistente de seis ondas de presión y de velocidad que regulan el flujo coronario en sístole y en diástole. El dominante es una presión diastólica de succión durante la relajación del ventrículo izquierdo, que se reduce significativamente en pacientes con HVI. Además, la HVI puede estar asociada a cambios en la presión ventricular izquierda mediante la activación de barorreceptores, que desempeña una función central en el síncope inducido por el esfuerzo. Estos tres fenómenos se relacionan con los síntomas típicos de la EA: disnea, angina y síncope (11).

Figura 5
Ley de Laplace
aplicada al
ventrículo
izquierdo.



3.2.2. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la EA se basa en la exploración física en los estudios diagnósticos de Electrocardiografía (ECG), radiografía, ecocardiografía, y la Tomografía computarizada multicorte (TCMC).

3.2.2.1. Exploración física

El pulso suele ser de menor amplitud (volumen sistólico reducido) y con ascenso retardado (eyección prolongada a través de una válvula estenótica, parvus et tardus. A la auscultación, el hallazgo característico es un soplo sistólico localizado en el borde esternal derecho alto (segundo espacio intercostal derecho) irradiado a la base del cuello.

3.2.2.1. Radiografía de tórax

Puede ser completamente normal. En casos de HVI se aprecia una morfología redondeada de la silueta cardíaca. La presencia de cardiomegalia indica dilatación ventricular. En fases de insuficiencia cardíaca aparecen datos de hipertensión venosa pulmonar (*Figura 6*).

Figura 6
Radiografía de tórax de paciente con EA.



3.2.2.3. Ecocardiografía

Es la técnica de elección para establecer el diagnóstico y llevar a cabo el seguimiento de la valvulopatía aórtica. Los objetivos de la técnica son: definir de forma precisa la anatomía valvular y la aorta ascendente, cuantificar el grado de la estenosis, valorar la repercusión de la misma sobre el VI, identificar otras lesiones valvulares, estimar la presión sistólica en arteria pulmonar y descartar otros procesos asociados.

3.2.2.3.1. Anatomía valvular y aorta ascendente

La técnica permite determinar el número de velos (bicúspide, tricúspide, monocúspide o tetracúspide), el grado y la extensión de la calcificación, y la evaluación de la aorta ascendente respecto a los diámetros a distintos niveles: anillo aórtico, senos de Valsalva, unión sinotubular y aorta ascendente.

3.2.2.3.2. Cuantificación del grado de estenosis

La velocidad del flujo aórtico se mide con ecocardiografía Doppler continuo, como la velocidad máxima a través de la VA. Este parámetro ha demostrado predecir el comienzo de los síntomas y la evolución clínica de pacientes asintomáticos. Así, una velocidad > 4 m/s es un indicador de gravedad de la valvulopatía y una velocidad pico > 5 m/s o la combinación de una válvula gravemente calcificada con un aumento rápido de la velocidad $> 0,3$ m/s al año son predictores de rápida progresión y mala evolución en el plazo de dos años en pacientes con EA grave asintomática. El gradiente máximo y medio de presión transaórtica se calculan a partir de las velocidades usando la ecuación de Bernoulli simplificada. El gradiente máximo se corresponde con la diferencia máxima entre la presión de la aorta y la presión instantánea en el VI. El gradiente medio se calcula integrando el gradiente máximo en toda la ecuación de la sístole. Existe una relación lineal entre los gradientes transaórticos máximo y medio que se obtiene con las siguientes ecuaciones.

$$AP_{\text{medio}} = (A_{\text{pmax}}/1,45) - 2,2 \text{ mmHg}$$

$$A_{\text{pmedia}} = 2,4 (V_{\text{max}})^3$$

Los gradientes medios medidos por Doppler y medidos en el laboratorio de hemodinámica representan la diferencia media de presión entre la aorta y el VI en el periodo de eyección, con buena relación si se registran simultáneamente. El gradiente “pico-pico” se corresponde con la diferencia entre la presión aórtica máxima y la presión máxima del VI. Éste no puede ser determinado mediante Doppler. El área valvular se calcula mediante la ecuación de continuidad, siendo este un método no invasivo y que no contiene una constante empírica. El cálculo se basa en el principio de continuidad de flujo.

$$AVA = (ITV_{\text{tsvi}} \times AST_{\text{tsvi}}) / ITV_{\text{ao}}$$

AVA: área valvular aórtica; ITV: integral velocidad-tiempo; tsvi: tracto de salida de VI; ao: aórtica; AST: área de la sección transversal.

3.2.2.3.3. Valoración de la repercusión sobre el VI

El objetivo es cuantificar la función sistólica, la función diastólica, la masa ventricular y los espesores ventriculares, y calcular los parámetros hemodinámicos de forma indirecta: presión sistólica pulmonar y presión AI (12).

3.2.2.4. Cateterismo cardíaco

La indicación principal del cateterismo cardíaco en la valvulopatía aórtica es la de la valoración de una posible enfermedad arterial coronaria (EAC). La coronariografía está indicada en pacientes con EAC conocida o sospechada por pruebas no invasivas, pacientes con disfunción ventricular, pacientes con más de un factor de riesgo cardiovascular, en varones de mayores de 40 años y en mujeres posmenopáusicas. La coronariografía invasiva en algunos casos puede ser sustituida por la coronariografía no invasiva mediante la (TCMC), dado que el riesgo de complicaciones con el cateterismo en pacientes con EA es algo más elevado (0,2%).

3.2.2.5. Prueba de esfuerzo

Está contraindicada en pacientes con EA grave sintomáticos debido al riesgo de complicaciones. En pacientes con EA grave asintomáticos está indicada para desenmascarar los síntomas, estratificar el riesgo, valorar el grado funcional y estudiar la respuesta tensional al esfuerzo y la inducción de arritmias. Siempre debe ser realizada bajo supervisión estricta. No es útil para descartar EAC asociada, dada la alta prevalencia de alteraciones eléctricas basales y durante el esfuerzo en pacientes con EA grave (13).

3.2.2.6. Tomografía computarizada multicorte

Actualmente la presencia de protocolos de baja radiación hace posible ampliar las indicaciones de estudio mediante (TCMC) a los pacientes con valvulopatías. La utilidad del estudio mediante esta técnica está definida a unas determinadas situaciones:

1. Cuantificar el área valvular, el calcio valvular y la distribución del mismo en casos de dudas diagnósticas ya que el valor del score de calcio de la-VA cuantificado mediante TCMD sin contraste se correlaciona con el área de la válvula y el grado de estenosis.
2. Coronariografía no invasiva antes de cirugía de remplazo valvular en pacientes con probabilidad pretest de EAC baja e intermedia, pudiendo ser sustitutivo al estudio invasivo.
3. Valoración de la anatomía valvular y de la aorta ascendente en casos de dilatación de la misma.
4. Estudio de pacientes re-operados: valorar la relación de los puentes coronarios con el esternón y la anatomía torácica.
5. Estudio completo del paciente previo a la implantación de prótesis percutánea (TAVI).
6. Como novedad respecto a las técnicas de imagen en la estenosis aórtica mediante el uso de TCMC Tomografía emisora de positrones (PET) y mar-

cadores de inflamación (18F-fluorodeoxyglucose y calcificación (18F-fluoride) permite estudiar el proceso de la degeneración valvular calcificada y los mecanismos inflamatorios (14) (15) (16).

3.2.2.7. Resonancia magnética

La resonancia cardiaca sin contraste y tras la administración de gadolinio es una técnica que aporta una excelente información tanto para el diagnóstico como para el pronóstico de la enfermedad valvular aórtica pero su uso está limitado por la disponibilidad de la misma. Mediante las distintas secuencias aporta información morfológica muy útil de la válvula y la raíz aórtica, así como funcional, siendo la técnica de referencia para la cuantificación de volúmenes, masa y FVI. Mediante secuencias específicas de realce tardío tras administración de gadolinio y secuencias T1 mapping, permite detectar fibrosis miocárdica focal y fibrosis miocárdica difusa, las cuales se han asociado a un peor pronóstico en la EA. Actualmente el uso de esta técnica en la práctica clínica queda limitado a los pacientes que la ecocardiografía no aporta a toda la información necesaria o a los casos de dudas diagnósticas en los que es necesario completar el estudio (17).

3.2.3. HISTORIA NATURAL Y TRATAMIENTO

Existe considerable evidencia que sugiere que la evolución clínica de la EA degenerativa, particularmente en Vas normales, es muy lenta. Esta evolución se asocia a un proceso gradual que comienza con el engrosamiento de los velos valvulares (situación conocida como esclerosis aórtica), sin aumento del gradiente transvalvular, y progresa hasta un estrechamiento severo de la válvula (18).

La severidad de las EA se establece según los valores de parámetros como la velocidad de la sangre a través de la válvula durante la sístole, le gradiente de presión medio y el área de la válvula aórtica medida (absoluta e indexada) (Tabla 1).

Tabla 1. Severidad de la EA. Grad.: gradiente, AVA: área de válvula aórtica

	ESCLEROSIS	LEVE	MODERADA	SEVERA
Velocidad (m/s)	<2,5	2,6-2,9	3,0-4,0	>4,0
Grad. Medio (mmHg)		<20	20-40	>40
AVA (cm ²)		>1,5	1,0-1,5	<1
AVA indexada (cm ² /m ²)		>0,85	0,60-0,85	<0,60

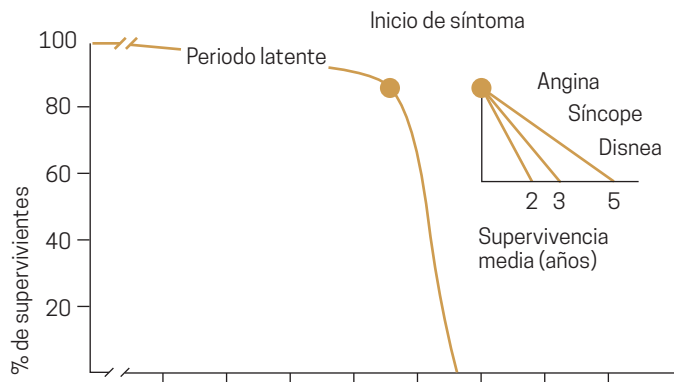
La historia natural de la EA en adultos no está bien definida. En la mayoría de los casos, el aumento progresivo del gradiente a través de la VA conduce a la aparición de síntomas. En aquellos pacientes con una velocidad del flujo $< 3,0$ m por segundo, se observa una supervivencia asintomática a los 2 años del 75-80%, mientras que en aquellos con una velocidad del flujo ≥ 4 m por segundo esta es del 30 al 50% (19).

En contraste con publicaciones previas, que indicaban un relativo buen pronóstico en pacientes con EA leve o moderada, estudios más recientes han sugerido que estos pacientes muestran peores resultados en seguimientos más cortos, estando estos no relacionados con la valvulopatía, sino con comorbilidades cardiovasculares. De todas formas, la validez de estos estudios ha sido cuestionada por la heterogeneidad de los parámetros y poblaciones evaluadas (20).

En el caso de la EA severa, una vez que aparecen los síntomas, típicamente disnea, angina y síncope, el pronóstico es muy pobre. En el frecuentemente citado estudio de Ross y Braunwald, publicado a finales de la década de los 60, se señalaba que la esperanza de vida media en pacientes con EA severa sintomática era de 2 años a 5 años con un incremento en el riesgo de muerte súbita (21) (22) (23) (*Figura 7*).

Figura 7

Historia natural de la EA severa.



En aquellos pacientes con EA severa sintomática, el único tratamiento efectivo es la sustitución valvular aórtica (SVA) por una prótesis biológica o mecánica, o el implante trans-cateter de una prótesis valvular (biológica). Este último procedimiento es conocido como “transcatheter aortic valve implantation” (TAVI). Estos tratamientos dan lugar a una mejora de la esperanza de vida, reducen los síntomas y mejoran la capacidad de ejercicio de estos pa-

cientes. En ausencia de otras enfermedades que pueden limitar la esperanza de vida o la calidad de vida, la sustitución valvular aórtica está indicada en la mayoría de los pacientes con EA severa que estén sintomáticos. Esta intervención se debe realizar lo antes posible tras la aparición de síntomas (19).

Tanto la SVA como el TAVI conllevan riesgos para el paciente en términos de complicaciones asociadas a los procedimientos y un gasto económico importante. La mortalidad intrahospitalaria de la SVA se sitúa entre el 4-6% en Europa y Norteamérica (24) (25). En España la mortalidad asociada a sustitución valvular aórtica aislada en el 2013 fue del 3,9% (26).

Aparte del riesgo de muerte, existe también un riesgo de complicaciones invalidantes como los accidentes cerebrovasculares. En un estudio reciente en pacientes mayores de 65 años intervenidos de SVA y en los que se hizo una valoración específica de este tipo de complicaciones, la incidencia fue del 17% (27).

Independientemente del riesgo asociado al procedimiento quirúrgico, existe igualmente riesgo de deterioro estructural de las prótesis, sobretodo de las biológicas, y de complicaciones graves asociadas a las propias prótesis valvulares.

Chan et al, en un estudio evaluando resultados a largo plazo en más de 3000 pacientes intervenido de SVA con prótesis biológicas o mecánicas, describieron un riesgo de morbilidad asociada a la prótesis (disfunción neurológica, trombosis valvular, tromboembolismo, hemorragia, endocarditis protésica o necesidad de re-operación) que variaba entre 3,4 y 3,8% para la prótesis biológicas y del 13,1 al 15,6% para las mecánicas a los 12 años de la intervención dependiendo de la edad del paciente cuando fueron operados. La necesidad de re-operación por deterioro estructural está estrechamente asociada al tipo de prótesis (mayor en las biológicas que en las mecánicas). A los 12 años variaba entre el 1,9% el 0 y el 1 % para las prótesis mecánicas y entre el 1,9% para mayores de 70 años y el 27,3% para los pacientes menores de 60 años para las prótesis biológicas (28).

En un estudio retrospectivo similar en 4253 pacientes de entre 50 y 69 años de edad, Chiang et al describieron una incidencia acumulada a los 15 años de ictus del 7,7% en los pacientes con prótesis biológicas y del 8,6% en pacientes con prótesis mecánicas, y de hemorragia mayor del 13% en pacientes con prótesis mecánicas y del 6,6% en aquellos con prótesis biológicas. La incidencia acumulada a los 15 años de re-operación fue del 12,1% en pacientes con prótesis biológica y del 6,9% en pacientes con prótesis mecánica (29).

Aparte del coste en mortalidad y morbilidad que se asocia a las SVA, existe también un importante coste económico asociado a la SVA o al TAVI. El coste intrahospitalario asociado a la SVA y al TAVI se ha calculado en 33.354±3357€ y 40.802±1399€ respectivamente (30).

3.2.4. EPIDEMIOLOGÍA

La EA es la lesión más común entre los pacientes tratados por enfermedades valvulares cardíacas y la indicación más frecuentemente de sustitución valvular quirúrgica en los países industrializados. En Europa y Norte América, la cardiopatía reumática era, hasta hace unas décadas, la causa más frecuente de EA. Sin embargo, con la disminución en la prevalencia de la fiebre reumática, en la actualidad la etiología más frecuente es la degenerativa (también llamada calcificante) (31).

En estudios epidemiológicos llevados a cabo en Europa y Norte América, la prevalencia de la estenosis aórtica moderada se ha estimado de una forma consistente de alrededor del 2% en individuos de 70 a 80 años de edad. Esta prevalencia se incrementa hasta el 3-9% en personas mayores de 80 años. La prevalencia de la EA está estrechamente asociada a la edad (32). Teniendo en cuenta estos datos y que en de Navarra, el 18% de la población es mayor de 65%, en la Comunidad Foral hay más de 2300 personas con esta dolencia (33).

3.3. FISIOPATOGENESIS DE LA ESTENOSIS AÓRTICA DEGENERATIVA

La EA degenerativa abarca un amplio espectro de entidades clínicas, que van desde la esclerosis aórtica (en la que no hay obstrucción al flujo a través de la VA) hasta la estenosis aórtica calcificada. Sin embargo, se acepta que tanto la esclerosis aórtica como la EA son parte del mismo proceso fisiopatológico en el que los velos de la VA sufren un proceso progresivo de fibrosis y mineralización que reduce su movilidad (34), de tal forma que la EA degenerativa se considera una enfermedad fibrocalcificante (35).

Varios estudios han documentado la existencia de un solapamiento en los factores clínicos tradicionalmente asociados a la aterosclerosis y la EA degenerativa (36) (37). En un estudio poblacional prospectivo que incluyó a 5621 adultos mayores de 65 años de edad, se identificaron los factores de riesgo para la EA degenerativa: edad avanzada, sexo masculino, tabaquismo, hipertensión e hiperlipidemia. La fortaleza de la asociación de estos factores con la EA, es comparable a la observada en entre estos y la enfermedad aterosclerótica, lo cual apoya la tesis de que existe un proceso común en ambas enfermedades (38) (39). Además, el estudio histopatológico de Vas obtenidas en procedimiento quirúrgicos de SVA por EA, indican la presencia en estas de procesos característicos de la enfermedad aterosclerótica como la infiltración lipídica, la inflamación y la calcificación (40) (41).

3.3.1. INFILTRACIÓN LIPÍDICA

En muestras de Vas con estenosis degenerativa se puede observar pequeñas acumulaciones extracelulares de lípidos distribuidas de forma focal en la región subendotelial y que se extienden hacia la lámina fibrosa. Las apolipoproteínas B, (a) y E están presentes en las cercanías de estas regiones ricas en lípidos, lo que implica que estos lípidos se derivan de lipoproteínas plasmáticas. En otros estudios se ha podido identificar colesterol LDL oxidado (LDLox) que ha sido incorporado por macrófagos para transformarse en células espumosas análogas a las observadas en las lesiones ateroscleróticas (42). En experimentos *in vitro*, se ha observado que el LDLox promueve la mineralización de cultivos de CIVs y la expresión de marcadores osteogénicos (43). Distintos estudios han sugerido que niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas altas, aumentan el riesgo tanto de esclerosis como de estenosis aórtica (44). También se ha demostrado que en sujetos con hipercolesterolemia ($\text{LDL} > 130 \text{ mg/dl}$), la progresión de la calcificación aórtica es más rápida que en los sujetos control (45). Igualmente, una mayor relación de colesterol total/colesterol de alta densidad (HDL) está independientemente relacionada con una mayor progresión de la EA (46). En pacientes asintomáticos con hipercolesterolemia familiar, la prevalencia de EA degenerativa subclínica es significativamente superior a la de controles, lo cual recalca el papel importante del colesterol LDL en la patogénesis de la enfermedad (47).

3.3.2. INFLAMACIÓN

Una característica celular común a todas las patologías clínicas que cursan con calcificación microvascular, incluida la EA degenerativa, es la inflamación. Se ha sugerido que el 15% de los 715 genes que se regulan de forma diferenciada en válvulas aórticas humanas calcificadas, están relacionados con la inflamación (48). Se ha demostrado que tanto el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), como la Interleuquina (IL) 1- β , la IL-6 y el LDLox, activan la biomineralización vascular y ciertos procesos transductores de osteogénesis vascular (49). La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que es secretada en respuesta a varios estímulos y que está sobre expresada en VA estenóticas. El LDLox es un componente patogénico y proinflamatorio de la hipercolesterolemia, que surge de la oxidación química extracelular espontánea del colesterol LDL (50). Niveles plasmáticos de LDLox elevados han sido asociados con una mayor remodelado fibrocalcificante y severidad de la EA degenerativa (51) (52). La presencia de un proceso inflamatorio en muestras de válvulas aórticas con estenosis degenerativa está independientemente relacionada con el proceso de remodelado tisular y gradientes transaórtico. Además, la densidad leucocitaria en estas

muestras se correlaciona con la expresión de TNF- α y con la velocidad de progresión de la EA (41). El proceso inflamatorio se acompaña de la expresión de MMPs, las cuales participan en el remodelado tisular. En particular, la MMP-9 se encuentra altamente expresada en las VA estenóticas (53).

Las células inflamatorias representan el tipo celular predominante en las lesiones iniciales de las Vas con estenosis degenerativa, pudiéndose identificar linfocitos T y macrófagos (42). Un componente clave de la inflamación es el estrés oxidativo intracelular, el cual es capaz de producir cascadas de señalización que dan lugar a la generación de especies de reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno y anión superóxido. Las especies reactivas de oxígeno tienen un papel patogénico en la EA degenerativa (49).

3.3.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

La hipertensión arterial es un factor de riesgo en la EA degenerativa y puede contribuir a la patogénesis de esta a través de la activación sistema renina-angiotensina (SRA). En pacientes pre-hipertensos, los niveles plasmáticos de angiotensinógeno y angiotensina II están asociados con la expresión de IL-6 en la válvula aórtica (54). En cultivos de CIVs, la angiotensina II estimula la expresión de TGF- β 1 proceso que es inhibido en presencia de losartán, un bloqueante de los receptores de angiotensina II (55) y en ratones hiperlipémicos, la administración de angiotensina II resulta en un engrosamiento significativo de los velos de la válvula aórtica (56). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) ha sido identificada en lesiones escleróticas de válvulas aórticas. La mayor parte de esta ECA es extracelular y se co-localizada con apolipoproteína B, un componente de partículas de LDL retenidas, lo que sugiere que la ECA puede ser transportada dentro de las lesiones en partículas de C-LDL (34). Además, la activación de los receptores mineralocorticoides (MR) pueden favorecer la EA debido a su efecto sobre la inflamación y la fibrosis. Se ha propuesto que la disfunción ventricular secundaria a la EA podría prevenida o tratada con antagonistas de estos receptores. Sin embargo, un estudio aleatorizado en 65 pacientes con EA moderada o severa tratados con eplerenona o placebo, y monitorizados durante una meda de 19 meses no demostró diferencias significativas en términos de progresión de la EA, desarrollo de HVI, y la aparición de disfunción sistólica o diastólica. Tal vez se requiera estudios con mayor número de pacientes y con periodos de seguimiento más largos para poder demostrar los beneficios de esta terapia (57)

3.3.4. MINERALIZACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

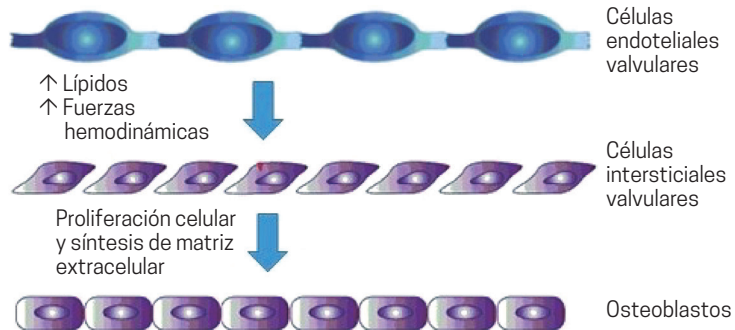
Aunque tradicionalmente la EA calcificada se había descrito como un proceso pasivo asociado al envejecimiento, hoy en día está bien establecido que la

mineralización de la VA no ocurre como resultado de una simple deposición pasiva de complejos de fosfato de calcio sobre los velos dañados de la VA (58). Por el contrario, esta consiste en un proceso activo en el que están involucradas tanto células circulantes y provenientes de la médula ósea (59) como CEVs y CIVs (60).

En los últimos años se ha identificado el papel de un nicho de células madre en la VA adulta. Existen dos requisitos para la existencia de un nicho de células madre en el adulto. El primero es definir la arquitectura física del nicho de células madre y el segundo definir el gradiente de proliferación a diferenciación dentro de este. La figura 8 muestra la arquitectura celular necesaria para un nicho de células madre en la VA, en la que las CEVs interaccionan con las CIVs como respuesta a la acción de lípidos y fuerzas hemodinámicas. Como resultado de esta interacción se produce un aumento de síntesis de MEC y una diferenciación a fenotipo secretor u osteoblástico (61).

Figura 8

Arquitectura celular de un nicho de células madre en la VA (modificado de 61).



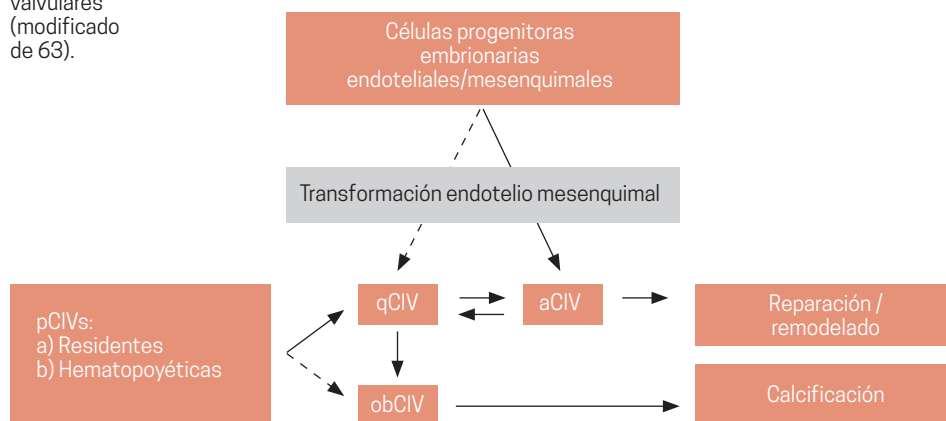
Estudios previos han demostrado que la respuesta valvular a una agresión o daño se caracteriza por una importante acumulación de CIVs asociadas a la aparición de células inflamatorias, como se ha señalado anteriormente, aumento de MEC y finalmente fibrosis y calcificación. Se ha sugerido que las CIVs mantienen la estructura y función valvular en situaciones normales, pero en la EA calcificada las CIVs se activan para regular la reparación y remodelado valvular (62).

La confirmación inicial de la existencia de osificación patológica en la VA humana fue demostrada por histomorfometría ósea y expresión de genes osteogénicos en válvulas enfermas. El origen más probable de los miofibroblastos y osteoblastos que aparecen y persisten en las VA con degeneración calcificante son las CIVs nativas, y en menor medida células mesenquimales resultantes de una transición endotelial y otros progenitores circulantes (1).

4. CÉLULAS INTERSTICIALES DE LA VÁLVULA AÓRTICA

Las CIVs son el tipo de célula más frecuente en la VA, y son diferentes a otros tipos de células mesenquimales de otros órganos. Se han identificado 5 fenotipos de CIVs, que incluyen: Progenitoras embrionarias de células endoteliales/mesenquimales, quiescentes (qCIVs), activadas (aCIVs), progenitoras (pCIVs) y osteoblásticas (obCIVs). Las células progenitoras embrionarias endoteliales/mesenquimales llevan a cabo un proceso de transformación endotelio-mesenquimal (TEM) que inicia el proceso de formación valvular en el embrión. Dan lugar a las vCIVs residentes. La TEM puede ser detectada por la pérdida de marcadores endoteliales y la adquisición de marcadores mesenquimales. Las qCIVs, están en reposo en la válvula del adulto y mantienen la homeostasis valvular. Las pCIVs representan el fenotipo menos definido y consiste en un grupo heterogéneo de células progenitoras que pueden tener un papel importante en la reparación valvular. Estas pueden ser hematopoyéticas y circulantes, o bien residentes en los velos valvulares. Las obCIVs se refieren a CIVs que experimentan una diferenciación osteoblástica y promueven calcificación como se puede observar en CIVs cultivadas en medios osteogénicos. Las obCIVs regulan la codrogénesis y la osteogénesis y secretan fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteopontina (*Figura 9*) (63).

Figura 9
Fenotipos
de células
intersticiales
valvulares
(modificado
de 63).



Las aCIVs son las células que regulan la respuesta patobiológica en situaciones de degeneración y daño. Su activación responde a distintos estímulos. Las aCIVs, una vez diferenciadas a partir de qCIVs, adquieren características de miofibroblastos y muestran aumento de la contractilidad, prominentes fibras de estrés y otras proteínas contráctiles. Las aCIVs no son células musculares lisas, porque estas tienen membranas basales intactas, mientras que las aCIVs muestran membranas basales incompletas. Se caracterizan por la expresión de actina de músculo liso (α -SMA) (64), que no está presente en las qCIVs y participan en los procesos de reparación valvular incluyendo la proliferación, migración y remodelado de la MEC. Como se ha señalado previamente, las qCIVs se diferencian a aCIVs en condiciones de daño patológico o de estrés hemodinámico o mecánico, en las que surgen CEVs activadas y macrófagos/células espumosas y aparecen citoquinas y factores de crecimiento que estimulan la activación de qCIVs. La activación de CIVs está asociada con un incremento de MEC, expresión de MMPs y TIMPs. Asimismo, las aCIVs aumentan la producción de citoquinas, siendo el TGF- β uno de los más importantes (65). Una vez que el proceso de remodelado finaliza, estas aCIVs son eliminadas por apoptosis. Cuando se produce una alteración en el proceso de apoptosis, persiste la generación de aCIVs, lo que combinado con la producción anormal de MEC y remodelado, puede resultar en fibrosis patológica, inflamación crónica y calcificación. Por esto, las aCIVs representan una diana terapéutica prometedora en la prevención y el tratamiento de la enfermedad valvular degenerativa.

Las CIVs presentan plasticidad en su fenotipo ya que se diferencian durante el desarrollo valvular, la degeneración patológica y el remodelado, de una forma quiescente hasta un fenotipo osteogénico. La activación de las CIVs da lugar a la expresión de marcadores específicos como la osteopontina, la osteonectina, el “run-related transcription factor 2” (RUNX2), α -SMA y fosfatasa alcalina. Además, las aCIVs expresan y remodelan de forma activa la fibronectina, que es un componente principal de la MEC. Las proteínas morfogénicas óseas (BMP) -2 y -4 son capaces de estimular la formación de hueso y están presentes in válvulas calcificadas (63, 66, 67).

Estímulos para la diferenciación de CIVs

Se han descrito varios estímulos para la diferenciación patológica de las CIVs. Entre ellos, y como se ha señalado anteriormente, la inflamación y la oxidación juegan un papel central. Por ejemplo, se ha documentado que las CIVs son una importante fuente de IL-6, y que esta es una señal clave para la producción de BMP-2 (68). Igualmente se ha sugerido que la IL-6 tiene capacidad de promover TEM (69). Indicadores de inflamación y de estrés oxidativo

se han identificado colocalizados en válvulas aórticas calcificadas y se ha demostrado que el último promueve la activación de miofibroblastos en estas válvulas (69).

Otro factor importante en la activación de las CIVs son las fuerzas biomecánicas anormales que pueden afectar a la válvula aórtica. Las válvulas cardíacas son estructuras pasivas que se abren y cierran debido a las fuerzas ejercidas por la sangre circundante. Los velos valvulares están expuestos a un estrés cíclico importante. Durante ciclo cardíaco, la VA interactúa íntimamente con el entorno y de esta forma está expuesta a una multitud de fuerzas mecánicas, que en situaciones fisiológicas contribuyen a la homeostasis del tejido valvular. Sin embargo, cuando estas fuerzas se alteran, se inducen cambios en la biología de la VA que pueden conducir a la degeneración de la misma (70). En general, la biomecánica de los velos valvulares se puede enmarcar en tres modos de fuerza o carga fisiológica: tensión, flexión y cizallamiento o cortante. Esta última se refiere a aquella que actúa tangencialmente al plano. Como se ha señalado, estos tres tipos de carga o estrés, aparecen de forma cíclica cuando la válvula se abre (flexión), permite el paso de la sangre (cizallamiento), se cierra (flexión) y previene el paso retrógrado de la sangre (tensión). La VA se abre durante la sístole, cuando el ventrículo izquierdo se contrae, y se cierra durante diástole cuando el ventrículo izquierdo se relaja. En el individuo sano, la sangre fluye a través de la VA con una aceleración pico de 1.35 ± 0.35 m/s. La VA se cierra hacia el final de la fase de deceleración de la sístole con un mínimo flujo reverso a través de la válvula. Las diferencias en presión axial son suficientes para cerrar la VA. En situaciones de EA severa, esta aceleración aumenta por encima de 4m/s (71, 72).

El estrés de cizallamiento producido por el flujo de sangre es un estímulo importante para el funcionamiento de las CEVs. La morfología de las células endoteliales varía a lo largo del árbol vascular, y existe una fuerte correlación entre la forma estas y el entorno biomecánico. *In vivo*, las células endoteliales vasculares adoptan una forma de elipses alargadas, con el eje largo alineado de forma paralela a la dirección del flujo de la sangre. Sin embargo, en zonas de bifurcación y de curvatura pronunciada, las células endoteliales vasculares son más grandes y esféricas(73). Se ha señalado que las CEVs porcinas muestran un patrón de alineación muy diferente al de las células endoteliales vasculares, ya que están alineadas con su eje largo paralelo al tejido subyacente circunferencialmente dispuesto, y por lo tanto perpendicular a la dirección del flujo sanguíneo (74).

La sensibilidad de las CEVs a los distintos entornos hemodinámicos puede ser la responsable de las diferencias en la expresión genética de las CEVs localizadas a ambos lados de los velos de la VA y por lo tanto de la diferente vulne-

rabilidad de ambos lados de los velos a la calcificación (75). Las alteraciones en el entorno hemodinámico valvular provocan la expresión de moléculas de adhesión endotelial en una forma dependiente de TGF- β y BMP-4 (76) y también la diferenciación de CEVs a un fenotipo de miofibroblasto con expresión de Actina de musculo liso (α -SMA) (74).

Por lo tanto, parece ser que un posible mecanismo por el que el estrés de cizallamiento contribuye a la homeostasis y al desarrollo de enfermedad valvular, es su regulación de la señalización paracrina de las CEVs a las CIVs. *In vitro*, las CIVs muestran una reducción significativa de la expresión de AML- α cuando las CEVs están sujetas a estrés de cizallamiento (77).

Los velos de la VA están sometidos a fuerzas de tensión durante la diástole, cuando el gradiente de presión transvalvular del ventrículo hacia la aorta hace que el velo se elonge en sentido circunferencial y radial. El aumento del gradiente de presión transvalvular, como ocurre en la hipertensión arterial, aumenta la fuerza de tensión sobre la VA. Varios experimentos han demostrado que un aumento patológico de la fuerza de tensión sobre tejido valvular o CIVs aisladas, pueden provocar respuestas asociadas al desarrollo de enfermedad valvular degenerativa, especialmente el aumento de síntesis de MEC y remodelado y activación de CIVs hacia un fenotipo secretor (67).

5. BIOMARCADORES EN LA EA

La importancia de la búsqueda de un biomarcador que refleje la severidad de la enfermedad, sea útil para la monitorización de su progresión, y sirva para evaluar el pronóstico y la respuesta al tratamiento se basa fundamentalmente en el manejo de los pacientes asintomáticos (78), pero también en su contribución al conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y al diseño de las futuras líneas de investigación en este campo (79).

En base a las distintas vías fisiopatológica involucradas en la EA, existen varios biomarcadores que pueden ser clínicamente útiles para el diagnóstico, pronóstico y monitorización de la EA degenerativa. La mayoría de los marcadores utilizados hasta la fecha han sido utilizados para evaluar la presencia y severidad de la EA degenerativa, pero no son útiles para evaluar el pronóstico o monitorizar su progresión. Una excepción parece ser el péptido natriurético tipo B (BNP) o su precursor NT-proBNP que es liberado por los miocitos como respuesta al estiramiento. Niveles elevados de BNP se han asociado con EA de bajo gradiente, disfunción ventricular izquierda y fibrosis miocárdica. El BNP parece ser un factor pronóstico independiente en la EA degenerativa, en particular en aquellos casos con estenosis severa y gradiente

transvalvular bajo. En la EA degenerativa, aquellos pacientes con niveles de BNP o NT-proBNP altos, tienen una menor supervivencia al año y una mayor probabilidad de desarrollar síntomas (80). Sin embargo, el BNP también está relacionado con la insuficiencia cardíaca y otras valvulopatías como la insuficiencia mitral (81).

Marcadores de disfunción endotelial como la dimetil-arginina asimétrica (ADMA), el activador tisular del plasminógeno (tPA), y la homocisteína han mostrado resultados modestos. Mientras que niveles plasmáticos elevados de ADMA y tPA están independientemente ligados a la EA degenerativa, la tPA no se identificó como predictora de la misma. Otros estudios han demostrado resultados conflictivos con estos marcadores, lo que indica la debilidad de los mismos (82).

Ciertos marcadores de estrés oxidativo como el malondialdehído, 8-hidroxi 2-deoxiguanosina, cisteína, homocisteína, cisteinilglicina y glutatión, han sido evaluados en términos de predicción de resultados en pacientes intervenidos por EA degenerativa. De todos ellos, el malondialdehído ha sido identificado como un predictor de resultados adversos tras la sustitución valvular aórtica por EA degenerativa (83).

La osteopontina, un marcador relacionado con la transdiferenciación osteoblastica, ha sido también estudiada en la EA degenerativa. En este estudio se demostró una correlación entre los niveles de osteopontina en plasma y la severidad de la EA (84).

Por otro lado, y tras indicarse que la degradación de multímeros de alto peso molecular del factor von Willebrand pueda estar relacionada con el estrés de cizallamiento sobre la VA, no sorprende que la actividad del factor von Willenbrand esté directamente relacionada con la severidad y la evolución clínica de la EA degenerativa (85).

Los microARNs (miRs) pertenecen a un tipo de más de 5000 ARNs no codificantes que regulan más de la mitad de los genes codificadores de proteínas, bien provocando su degradación, o previniendo su traducción. Los miRs son unos reguladores clave en procesos biológicos complejos implicados en alteraciones cardiovasculares, como la HVI, la enfermedad arterial coronaria, la insuficiencia cardíaca, la hipertensión y las arritmias cardíacas. Aparte de esto, los miRs se vislumbran como biomarcadores prometedores en el infarto agudo de miocardio y en la insuficiencia cardíaca (86). En este contexto, algunos estudios han sugerido que los miRs podrían jugar un papel en las enfermedades de las válvulas cardíacas. Aunque esta área de investigación está todavía en su infancia, se ha indicado que los miARNs podrían participar en la activación de CIVs y su diferenciación a fenotipo fibroblástico, con la consecuente fibrosis y calcificación vavular (87).

6. LA GALECTINA-3

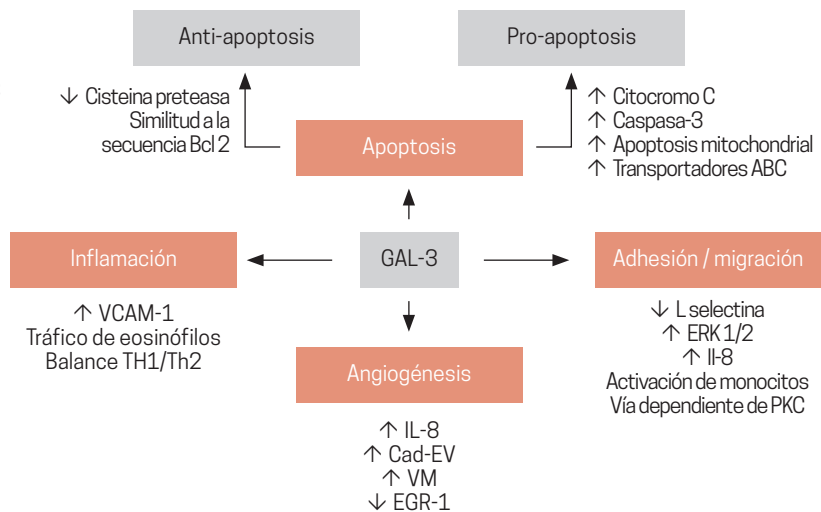
6.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La Galletina-3 (Gal-3), también conocida como Mac-2, CBP-30, CBP-35 o L-29 fue descrita por primera vez en 1984 (88). Es una proteína de 29 a 35 kDa, perteneciente a la familia de lectinas y con afinidad característica por los α -galactósidos que interactúa con receptores celulares de superficie y proteínas de la MEC (88, 89). Tiene dos dominios: el N-terminal, que es una estructura flexible esencial para su actividad biológica y que contiene los sitios susceptibles a la fosforilación, y el dominio CRD, similar a las otras galectinas, que contiene los lugares de unión a carbohidratos (90).

Cada vez hay más evidencia de que la Gal-3 está activada en modelos de fibrosis y que está anormalmente elevada en pacientes con procesos fibróticos, y también de que los inhibidores de la Gal-3 protegen de estos procesos (85, 91-97). Estos estudios, muchos de ellos realizados por nuestro grupo, sugieren que la Gal-3 puede ser un mediador importante en los procesos de fibrosis tisular y una diana terapéutica efectiva. Es decir, la inhibición de Gal-3 protegería frente a los procesos fibróticos patológicos.

La Gal-3 puede encontrarse expresada en el citoplasma, núcleo y membrana de las células, así como también puede ser secretada y localizarse en la MEC y el torrente circulatorio. Un gran número de estudios han demostrado que la Gal-3 es principalmente secretada por macrófagos que intervienen en la inflamación aguda y crónica, y en la inmunidad innata y adquirida (98-101). La Gal-3 tiene efecto sobre varios procesos fisiológicos y patológicos que incluyen apoptosis celular, adhesión, migración, angiogénesis y respuesta inflamatoria (*Figura 10*).

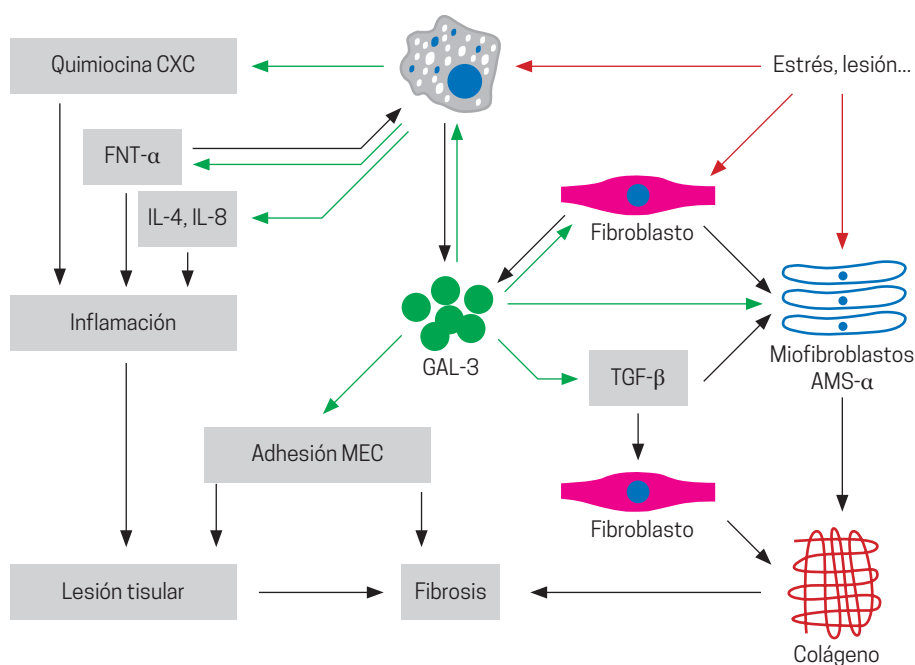
Figura 10
Procesos sobre los que actúa la Gal-3 (modificada de 102).



En cuanto a la regulación de la expresión de Gal-3, se ha descrito que la producción de Gal-3 por fibroblastos y macrófagos puede ser estimulada por distintos tipos de estrés, como choque térmico, radiación y estrés oxidativo entre otros estímulos (103-105) (*Figura 11*). Es decir, los niveles de gal-3 aumentan en las células en respuesta al estrés o al daño celular.

Figura 11

Estímulos y acciones de la Gal-3 (Figura modificada de 102).



La Gal-3 ha sido asociada a procesos tumorales diversos. La Gal-3 inhibe el ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL), una citoquina pro-apoptótica, al activar mediante fosforilación la proteína Akt (una proteínaquinasa implicada en la mediación de una variedad de respuestas biológicas) en el carcinoma vesical (106). La Gal-3 también se ha asociado con la transformación maligna del epitelio tiroideo en carcinoma de tiroides (107), con el potencial de malignidad de tumores del sistema nervioso central (108, 109) y con la evolución del cáncer colorrectal (110), de mama (111), y de próstata (112, 113).

La función y expresión de Gal-3 en otros tejidos y tipos celulares se resume en las siguientes tablas:

Tabla 2. Efecto de la Gal-3 en distintos tipos de tejidos

TIPO DE TEJIDO	EFEECTO	REFERENCIAS
Corazón	Fibrosis/remodelado	(114-116)
Sistema vascular	Fibrosis/Calcificación	(90, 117)
Riñón	Fibrosis/Inflamación	(118, 119)
Hígado	Fibrosis	(120) (121)
Pulmón	Fibrosis	(95)

Tabla 3. Efecto de la Gal-e en distintos tipos celulares

TIPO DE CÉLULAS	EXPRESIÓN	EFEECTO	REFERENCIAS
Fibroblastos	Sí	↑ proliferación ↑ colágeno	(122)
Cardiomiocitos	Sí	↑ tamaño ↑ colágeno	(123) (124)
Endotelio	Sí	↑ proliferación ↑ angiogénesis	(125) (126)
Células renales	Sí	↑ colágeno ↑ supervivencia	(125)
Células musculares lisas	Débil	Aumenta colágeno	(127) (90)
Células inflamatorias	Sí	↑ migración ↑ supervivencia	(128)
Adipocitos	Sí	↑ proliferación	(129)

6.2. INHIBICIÓN DE GAL-3

El inhibidor de Gal-3 más estudiado es la pectina modificada del limón (MCP). La pectina es una fibra polisacarida con ramas complejas y rica en residuos galactósidos que se encuentra en las paredes celulares de todas las plantas. Inicialmente se dijo que se unía la carninógeno 1,2-dimethylhydrazine con una eficiencia que se incrementaba a la vez que el pH subía de ácido a alcalino. En su forma nativa, la pectina cítrica tiene una solubilidad en agua limitada, y es incapaz de interactuar con Gal-3. Sin embargo, en su forma modificada, es decir, hidrolizada para formar fibras lineales más pequeñas y solubles, actúa como ligando para Gal-3 (130). El MCP, se obtiene de la piel y pulpa de frutas cítricas, y modificada por un tratamiento de ph alto y temperatura, se ha convertido en una de los agentes anti-metastásicos más prometedores. Su efecto anti tumoral se ha estudiado en melanoma, carcinoma de próstata, de mama, de colon, en el mieloma múltiple y en el hemangiosarcoma (131) Además de su efecto en tumores, y como inhibidor de Gal-3, también se tiene capacidad antifibrótica en hígado (132), riñón(133) y corazón(134), y antiinflamatoria a nivel neuronal (135).

Otros inhibidores de Gal-3 se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Otros inhibidores de la Gal-3

INHIBIDOR	ESTUDIADO EN	EFECTO	REFERENCIA
Gal-3 recombinante soluble con NH2 truncado	Carcinoma de mama humano	↓ de metástasis y tumor primario	(136)
Anticuerpos anti Gal-3	Tumores de mama y próstata humanos	↓ depósito de células tumorales en hueso y pulmón	(137)
D-galactosa	Sarcoma de pulmón murino	↓ metástasis hepáticas	(138)
GR-MD-02	Steatohepatitis	↓ fibrosis	(139)
1-metil-b-D-lactosido	Melanoma murino	↓ metástasis pulmonares	(140)
Células inflamatorias	Sí	↑ migración ↑ supervivencia	(128)
Adipocitos	Sí	↑ proliferación	(129)

6.3. LA GAL-3 EN LA EA

Como se ha señalado anteriormente, la EA degenerativa se caracteriza por un periodo silente largo. Los síntomas típicos de la EA (angina, disnea, síncope) aparecen una vez que la enfermedad ha progresado a una fase avanzada. Una vez que han aparecido estos síntomas, un 90% de pacientes con EA severa tienen una esperanza de vida menor de 10 años y en el caso de insuficiencia cardíaca congestiva, la mortalidad al primer año es del 50% (141, 142). Dada la ausencia de un tratamiento farmacológico que sea capaz de ralentizar o frenar la calcificación progresiva de la VA de una forma eficaz, la sustitución valvular aórtica, que conlleva un coste económico y de morbilidad y mortalidad significativo, es el tratamiento de elección para estos pacientes.

En general, el uso de biomarcadores tiene como propósito la identificación de una enfermedad, el estadiaje según su grado de evolución, ofrecer información sobre su pronóstico y finalmente servir como diana terapéutica en la prevención, control o tratamiento de la misma. Por lo tanto, en el caso de la EA degenerativa es necesario el desarrollo de biomarcadores que aparte de poder ser utilizados como marcadores de severidad o riesgo del proceso, puedan ser utilizadas como dianas terapéuticas (49).

El papel de la gal-3 como marcador en la EA ha sido objeto de varios estudios. Arangalage et al no encontraron una asociación entre niveles plasmáticos de Gal-3 y severidad de la EA (143). Otros estudios han estudiado el posible valor de los niveles plasmáticos de Gal-3 como predictor de los resultados tras la intervención sobre la VA. Estos han ofrecido resultados variables, ya que mientras algunos han demostrado una asociación entre niveles plasmáticos de Gal-3 y resultados tras el tratamiento percutáneo de la EA severa (TAVI) (144), otros no han sido capaces de demostrar dicha asociación (143, 145). Otros estudios se han concentrado en el análisis del papel de la Gal-3 en la fibrosis miocárdica y disfunción ventricular en pacientes con EA severa, observándose una asociación entre fibrosis miocárdica y la expresión de Gal-3 tanto en plasma como en miocardio (122, 146). Sin embargo, hasta el momento no se ha publicado ningún estudio en el que se evalúe el papel de la Gal-3 en la calcificación degenerativa de la VA.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

En pacientes con EA degenerativa, la Gal-3 promueve la calcificación de la VA modulando la diferenciación osteogénica de las células intersticiales valvulares. La inhibición de la Gal-3 puede prevenir o retrasar de la calcificación de la válvula aórtica en pacientes con EA degenerativa.

BASES DE LA HIPÓTESIS

1. La fisiopatología de la EA degenerativa no está completamente definida.
2. La EA se asemeja a la aterosclerosis y la enfermedad arterial degenerativa. No solo comparten factores de riesgo, si no también características fisiopatológicas como la inflamación crónica, el aumento de matriz extracelular, la proliferación y diferenciación de células intersticiales valvulares, y el desarrollo de lesiones calcificadas.
3. La Gal-3 es un miembro de la familia de las lecitinas con acción beta-galactosidasa.
4. La Gal-3 juega un papel importante en el remodelado cardíaco y vascular, a través de su capacidad de estimular el depósito de matriz extracelular y la acción de importantes moléculas pro-inflamatorias.
5. Además, la Gal-3 modula la diferenciación osteogénica de las células musculares vasculares lisas, jugando un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el papel de la Gal-3 en la de generación valvular en pacientes con EA severa sintomática.

CONCRETOS

1. Valorar la asociación de Gal-3 con la calcificación valvular en la EA severa.
2. Analizar el efecto de la Gal-3 y de su inhibición sobre la diferenciación osteogénica de células intersticiales valvulares humanas.
3. Evaluar el efecto de la Gal-3 y de su inhibición sobre la calcificación de la VA en un modelo de animal pequeño.

Material y métodos

1. ESTUDIO EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON EA SEVERA SINTOMÁTICA

En este estudio prospectivo y observacional, se incluyeron, de forma consecutiva, 77 pacientes con EA severa sintomática e intervenidos, tras discusión en la sesión médico-quirúrgica del Área del Corazón del Complejo Hospitalario de Navarra, de SVA entre junio de 2013 y febrero de 2015. EA severa se definió como un AV aórtica de $\leq 1 \text{ cm}^2$ y/o un gradiente de presión medio a través de la VA de $>40 \text{ mmHg}$.

Los factores de exclusión fueron enfermedad valvular cardíaca concomitante de grado moderado o severo, tumor maligno, estados inmunodeprimidos, y enfermedades inflamatorias crónicas.

Todos los pacientes fueron evaluados por ecocardiografía según se detalla a continuación. Los estudios ecocardiográficos fueron realizados mediante ecocardiografía transtorácica convencional utilizando dos equipos de alta gamma, modelo IE-33 (Philips) y Vivid-7 (General Electric). Mediante sonda ecocardiográfica multifrecuencia 2D. Los datos fueron analizados en una estación de trabajo modelo X-Celera y Echo pack respectivamente. Las proyecciones ecocardiográficas analizadas fueron: paraesternal eje largo, paraesternal eje corto, plano apical 4 cámaras, 2 cámaras, 3 cámaras, plano subcostal y supraesternal. Los estudios fueron realizados utilizando la bidimensional, modo M, doppler color, doppler continuo y pulsado. Se obtuvieron los siguientes parámetros:

Parámetros morfológicos

Dimensiones ventriculares: diámetro tele-sistólico (DTSVI), diámetro tele-diastólico (DTDVI), espesor de septo interventricular (SIV) y espesor de pared posterior de VI (PPVI) en mm (mediante modo M y/o bidimensional).

- Morfología valvular y grado de calcificación (valoración subjetiva).
- Dimensión AI en mm (mediante modo M y/o bidimensional).

Parámetros funcionales

Medida de FEVI mediante fórmula de Teicholz en % (mediante modo M) y/o mediante fórmula Simpson % (mediante modo bidimensional).

- Medida de AV mediante ecuación de continuidad.
- Cuantificación de gradientes transvalvulares (máximo y medio) mediante ecuación de Bernoulli mediante Doppler continuo.
- Valoración de función diastólica mediante Doppler pulsado.
- Cuantificación del grado de insuficiencia valvular mediante Doppler color.

Se obtuvo consentimiento informado de cada paciente y control. El estudio se llevó a cabo según las guías éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 tal y como se refleja por la aprobación del Comité Ético de Investigaciones Clínica del Complejo Hospitalario de Navarra.

2. ANÁLISIS DE LAS VÁLVULAS AÓRTICAS

Las VAs humanas (n=77) se obtuvieron durante el procedimiento quirúrgico y fueron enviadas al laboratorio en un contenedor estéril y en suero salino a temperatura ambiente. Como controles se utilizaron VAs no calcificadas obtenidas de autopsias (n=11). Las muestras fueron rápidamente seccionadas en dos piezas. Una pieza fue fijada en formol y embebida en parafina para realizar análisis histológicos y la otra fue congelada en nitrógeno líquido para realizar técnicas de biología molecular (RT-PCR y Western Blot). Tanto las técnicas histológicas como las de biología molecular se detallan más adelante, ya que son comunes a los diversos modelos celulares y animales utilizados en este estudio.

3. ANÁLISIS DEL SUERO DE LOS PACIENTES

En el momento del ingreso para la cirugía, se extrajo sangre venosa para la medición de BNP, marcadores de función renal (creatinina y tasa de filtrado glomerular MDRD-4) y otros parámetros de laboratorio rutinarios. Además, se guardó una muestra de suero para medir las moléculas de interés a -80°C.

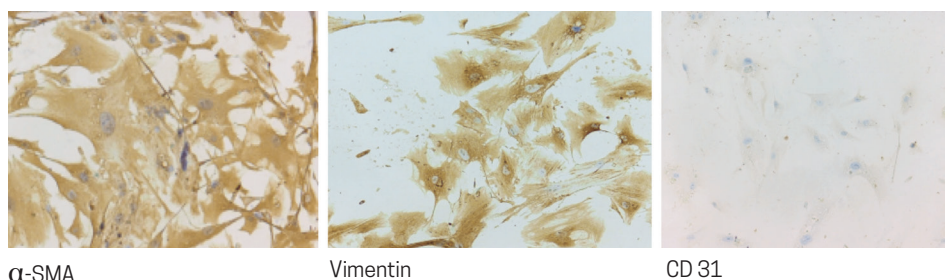
4. EXPERIMENTOS CON CIVS AÓRTICAS HUMANAS

4.1. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CIVS

Para los estudios *in vitro*, se obtuvieron CIVs aórticas de Vas de 7 pacientes. Para los experimentos se utilizaron mezclas de CIVs de entre 3 y 5 pacientes de edades similares. Las CIVs aórticas se aislaron utilizando digestión secuencial de colagenasa para eliminar las células endoteliales. Las CIVs fueron entonces recogidas por centrifugación y caracterizadas con una tinción de α -SMA y vimentina consistente con un fenotipo de miofibroblasto. Las CIVs fueron negativas para CD31 (marcador de célula endotelial) (*Figura 12*). Las CIVs fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM F-12 suplementado con

siero fetal bovino al 10%. Todos los ensayos se realizaron a 37°C, aire estéril al 95% y 5% CO₂ en un incubador de saturación humidificada.

Figura 12
Caracterización
de las CIVs
primarias.



4.2. TRATAMIENTOS

Las células fueron tratadas con Gal-3 (10⁻⁸ M, R&D Systems) durante uno a seis días para evaluar el efecto de la Gal-3 sobre marcadores de inflamación, fibrosis y calcificación.

Además, se estimularon CIVs con Gal-3 a tiempos cortos (5, 10, 15, 30, 60 minutos) para analizar la fosforilación de vías de señalización intracelular.

Los siguientes inhibidores químicos se añadieron a 10⁻⁵ mol/L 1 hora antes de la estimulación con Gal-3: Wortmanina (inhibidor de la vía de Akt, Sigma-Aldrich), PD98059 (inhibidor de la vía de p42/44 MAPK, Sigma Aldrich), SB203580 (inhibidor de la vía de p38MAPK, Sigma Aldrich), y BAY 11-7082 (inhibidor de la vía de NFκB, Sigma Aldrich).

4.3. CULTIVO DE VICS EN MEDIO PRO-OSTEOGÉNICO

Con el fin de inducir calcificación, las CIVs fueron cultivadas en un medio pro-calcificante que consistía en DMEM F-12 suplementado con 10 mM β-glicerofosfato, 50 μg/ml ácido ascórbico, 10 nM dexametasona, suero fetal bovino al 10%. Las células fueron tratadas en presencia o ausencia de pectina cítrica modificada (MCP; Enconugenics, 10⁻⁶M), un inhibidor farmacológico de la actividad de la Gal-3, cada 2-3 días. A los días 7, 14 y 21 de tratamiento, los extractos celulares y sobrenadantes fueron recogidos para analizar los marcadores de inflamación, fibrosis y calcificación mediante ELISA y Western Blot.

4.4. SILENCIAMIENTO DE GAL-3 POR EDICIÓN GENÓMICA MEDIANTE CRISPR/CAS9

El silenciamiento (“knockdown”) de Gal-3 se realizó por medio de edición genómica guiada por CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindrome repeats). Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, a una confluencia del 70% y transfectadas con un conjunto de tres plásmidos, cada uno codificando la nucleasa Cas9 y un ARN guía específica de 20 nucleótidos diseñada para una eficiencia máxima de silenciamiento de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Santa Cruz Biotechnology). Una mezcla de plásmidos de ARNg CRISPR/Cas9 se utilizó como control. Una vez que se generó el silenciamiento de Gal-3, las CIVs se cultivaron en un medio osteogénico como se ha descrito anteriormente. A los días 7, 14 y 21 de tratamiento, los extractos celulares y sobrenadantes fueron recogidos para analizar los marcadores de inflamación, fibrosis y calcificación mediante ELISA y Western Blot.

5. MODELO ANIMAL

En modelo animal se utilizaron ratas macho Wistar de 250 g de peso aproximadamente (Harlan Iberica, Barcelona, España).

Las ratas fueron distribuidas en tres grupos diferentes:

1. Grupo control (Control, n=7)
2. Grupo con pinzamiento parcial de aorta ascendente (PA, n=7). El pinzamiento parcial de la aorta ascendente se realizó por los Laboratorios Harlan como ya se ha descrito previamente, y de acuerdo a un método utilizado por varios autores (20). La aorta ascendente se ocluyó parcialmente con un clip hemostático. El objetivo del PA en este modelo es el de perturbar el flujo de sangre a través de la VA, alterando así el entorno biodinámico de la VA y de esta forma la degeneración de los velos valvulares.
3. Grupo con PA y tratadas con inhibidor de Gal-3 MCP en el agua de bebida (PA+MCP, n=7). El tratamiento con MCP se inició el día anterior al pinzamiento de la aorta ascendente y se continuó durante 6 semanas.
4. Transcurridas las 6 semanas de tratamiento, las ratas fueron finalmente sacrificadas previa anestesia con una mezcla de ketamina (Imalgene 1000) 70mg/kg y xilacina (Rompun 2%) 6mg/kg, por decapitación mediante el empleo de guillotina. El efecto de la anestesia se evaluó mediante métodos veterinarios estandarizados que incluyen la ausencia de

reflejos musculares, pérdida del tono de la mandíbula y de los reflejos oculares y el cambio en el tamaño de la pupila. Una vez sacrificados los animales, se procedió a la extracción de todas las muestras, centrándose nuestro estudio en la válvula aórtica.

El Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid aprobó todos los experimentos de acuerdo a las guías éticas de para el cuidado de animales experimentales de la Unión Europea.

El peso corporal se midió una vez por semana. Asimismo, la ingesta tanto de agua como de comida fue controlada a través de todo el periodo experimental.

La presión arterial sistólica se midió semanalmente de manera indirecta en la arteria caudal de la cola de las ratas mediante un método pletismográfico (Narco Bio-Systems, Houston, Tx USA). Días antes de comenzar el experimento se acostumbró diariamente a las ratas al proceso de medida de la presión que consistía en mantener las ratas en una habitación con una temperatura mantenida a 28° C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se les medía la presión arterial sistólica. Una vez que los animales se acostumbraron al proceso de medida, se determinó la presión arterial sistólica, siendo esta la media aritmética de ocho medidas sucesivas en dos días consecutivos y la misma hora.

6. TÉCNICAS DE LABORATORIO EMPLEADAS

6.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Las tinciones tisulares se llevaron a cabo en secciones transversales de velos valvulares aórticos humanos y de rata. Las muestras de válvulas severamente calcificadas se decalcificaron en una solución al 10% de ácido fórmico durante 24 horas. Las muestras se deshidrataron en baños crecientes de alcohol etílico y finalmente en xilol. Una vez deshidratado el tejido se incluyó en parafina líquida a 56° hasta su posterior análisis. Los bloques incluidos en parafina se cortaron en secciones de 5 µm con un micrótopo de rotación (Leica).

Las secciones fueron tratadas con H₂O₂ durante 10 minutos para bloquear la actividad peroxidasa. Todas las secciones fueron bloqueadas con suero de cabra al 5% normal en PBS durante una hora e incubadas durante la noche con Gal-3, BMP-2, BMP-4, Runx2, Sox-9, cd68, cd80 y TNF-α, lavadas tres veces, y después incubadas durante 30 minutos con el polímero marcado por peroxidasa de rábano picante conjugado a anticuerpos secundarios (Dako

Cytomation, Carpentaria, CA, USA). La señal se relevó utilizando el sustrato diaminobencidina (Leica). Las condiciones se detallan en la Tabla 5.

Además, se realizaron dobles tinciones para detectar simultáneamente dos moléculas diferentes. El revelado se realizó con diaminobencidina (que proporciona una coloración marrón) para uno de los antígenos y con Fast-red (que proporciona una coloración roja brillante) para la otra proteína de interés. Muestras de referencia de todas las tinciones antes y después de la descalcificación, fueron comparadas para comprobar que el proceso de descalcificación no había interferido con las tinciones y por lo tanto con el resultado y la interpretación de las mismas.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en el estudio inmunohistoquímico

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Gal-3	1:1000	Thermo Scientific
Vimentina	1:500	Santa Cruz Biotechnology
α-SMA	1:2000	Sigma Aldrich
BMP-2	1:500	Thermo Scientific
Osteopontina	1:500	Abcam
Runx2	1:500	Sigma Aldrich
Sox-9	1:500	Sigma Aldrich
TNF-α	1:1000	R&D Systems
CD68	1:500	Abcam
CD80	1:500	Santa Cruz Biotechnology

6.2. ELISA

En la Tabla 6 se detallan los ELISAS utilizados para las muestras biológicas del estudio.

6.3. PCR EN TIEMPO REAL POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA

El ARN total de las VAs humanas se extrajo con Reactivo Trizol (Euromedex, Souffelweyersheim, France) y purificado utilizando el equipo RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La primera cadena de ADNc se sintetizó de acuerdo a las instrucciones del fabri-

Tabla 6. ELISAS utilizados en el estudio

MOLÉCULA	FUNCIÓN	MUESTRA	CASA COMERCIAL
Gal-3	Molécula objeto de nuestro estudio	Suero de pacientes	BG Medicine
Proteína C reactiva	Inflamación	Suero de pacientes	R&D Systems
IL-6	Inflamación	Suero de pacientes. Sobrenadante CIVs. Tejido VA	R&D Systems
TNF	Inflamación	Suero de pacientes Sobrenadante CIVs	R&D Systems
IL-1-β	Inflamación	Sobrenadante CIVs	R&D Systems
Mieloperoxidasa	Activación leucocitaria	Suero de pacientes	R&D Systems
IL-8	Activación leucocitaria	Suero de pacientes	R&D Systems
L-selectina	Activación leucocitaria	Suero de pacientes	R&D Systems

cante (Roche). El ARN se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) empleando la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. La retrotranscripción del ARNm se realizó en un volumen de 20µl. De cada muestra se incubaron 5µg de ARN, con un cebador de Oligo (dT) (500mg) el cual hibrida con la cola Poli-A del ARNm, a una temperatura de 70°C (temperatura de hibridación del cebador) durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron los reactivos para la retrotranscriptasa cuyas concentraciones fueron: 1x de tampón de reacción RT, dNTPs (1mM), DTT (10mM), PowerScript™ -RT (0.125U/µl). La reacción se realizó en un termociclador durante 90 minutos a 42°C, tras este periodo la enzima se desactivó calentando la mezcla de reacción a 70°C durante 15 minutos. Una vez finalizada la reacción, las muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

El análisis del PCR cuantitativo se llevó a cabo utilizando tecnología SYBR Green PCR (Biorad) (Tabla S1). El SYBR Green es un colorante que se une al ADN de doble cadena por el surco menor del ADNds incrementando su fluorescencia unas cien veces.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción se preparó añadiendo: 5µl de cada muestra estando todas las muestras a la misma concentración de ADNc, 6 µl de agua ultrapura, 0.75 µl de cebador sentido, 0.75 µl de cebador antisentido, y 12.5 µl de mezcla Fast Start DNA Master SYBR Green, la cual contiene dNTP, la polimerasa Fast Start y el fluorocromo SYBR Green. Los cebadores usados son específicos para las secuencias de humano, y se muestran en la Tabla 7. Se utiliza-

ron HPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa) y α -actina como gen de control endógeno. La cuantificación relativa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del software MyiQ (Bio-Rad). Los datos fueron normalizados por HPRT y niveles de β -actina y expresados como porcentaje relativo a los controles. Todas las PCR se realizaron al menos por triplicado para todas las condiciones experimentales.

Tabla 7. Cebadores utilizados en el estudio

GEN	CEBADORES	SECUENCIAS (5' a 3')
Col1a1	Sentido	GGACACAGAGGTTTCAGTGGT
	Antisentido	CACCATCATTTCCACGAGCA
Col3a1	Sentido	CTTCTCTCCAGCCGAGCTTC
	Antisentido	TGG AGG TTA GTG GGA GCA TC
α-SMA	Sentido	ACTGCCTTGGTGTGTGACAATGG
	Antisentido	TGGTGCCAGATCTTTCCATG
TGF-β	Sentido	TACCTGAACCCGTGTTGCTC
	Antisentido	CCGGTAGTGAACCCGTTGAT
CTGF	Sentido	CTCGCGGCTTACCGACTG
	Antisentido	GGCTCTGCTTCTCTAGCCTG
MMP-1	Sentido	ACATGAGTCTTTGCCGAGG
	Antisentido	AACAAGGTTGACTTTATTCCAAACA
MMP-2	Sentido	CGACCACAGCCAACTACGAT
	Antisentido	GTCAGGAGAGGCCCCATAGA
MMP-9	Sentido	ATGTACCGCTTCACTGAGGG
	Antisentido	TCAGGGCGAGGACCATAGAG
TIMP-1	Sentido	GGAATGCACAGTGTTCCTG
	Antisentido	GGAAGCCCTTTTCAGAGCCT
TIMP-2	Sentido	GCTGCGAGTGCAAGATCACG
	Antisentido	AGAGCTGGACCACTCGAAAC
BMP-2	Sentido	TGCGGTCTCCTAAAGGTCG
	Antisentido	GGGGTGGGTCTCTGTTTCAG
BMP-4	Sentido	AGCTTCCACCACGAAGAAT
	Antisentido	AAGCCCCTTTCCCAATCAGG

OPN	Sentido	CAAACGCCGACCAAGGAAAA
	Antisentido	AGCTGCTTTTCCTCAGAACT
Sox-9	Sentido	GAGGAAGTCGGTGAAGAACG
	Antisentido	ATCGAAGGTCTCGATGTTGG
Runx2	Sentido	GGTTAATCTCCGCAGGTCACT
	Antisentido	CACTGTGCTGAAGAGGCTGTT
IL-6	Sentido	AGTTCCTGCAGAAAAAGGCAAAG
	Antisentido	CATTGCGCAAGAGCCCTCA
CCL-2	Sentido	TCCCAAAGAAGCTGTGATCTTCA
	Antisentido	TTTGCTTGTCAGGTGGTCC
TNF-α	Sentido	CACTGAAAGCATGATCCGGG
	Antisentido	CTGGGGAACCTCTCCCTCTGG
Galectina-3	Sentido	TTTCGCTCCATGATGCGTTA
	Antisentido	GCCTGTCCAGGATAAGCCC
HPRT	Sentido	TTGCTTTCCTTGGTCAAGCA
	Antisentido	ATCCAACACTTCGTGGGGTC
β-Actina	Sentido	GCCGCCAGGCTACCAT
	Antisentido	TCGATGGGGTACTTCAGGGT

6.4. WESTERN BLOT

Alicuotas de 40 μ g de proteínas de VA humana o de CIVs fueron desnaturalizadas calentándolas a 95°C durante 5 minutos en presencia de β -Mercaptoetanol y separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Para llevar a cabo la electroforesis, se prepararon geles inferiores de acrilamida a diferentes concentraciones para separar las proteínas a estudiar. Posteriormente, se preparó un gel superior con una concentración de acrilamida al 4%. Una vez completada la carga en los geles superiores, se sumergió todo el sistema en la solución de electroforesis (Anexo A) y se aplicó una corriente a un amperaje constante de 50 mA durante una hora y media aproximadamente, creando un campo eléctrico que separó las proteínas de las muestras. Una de las calles del gel se empleó para el marcador de peso molecular conocido. Finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia utilizando el sistema rápido de Biorad durante 7 minutos. Para la inmunodetección se bloquearon las membranas en PBS-

Tween al 0.1% con un 5% de leche en polvo durante una hora a temperatura ambiente. Las condiciones de cada inmunodetección, incluyendo las condiciones de incubación con el anticuerpo primario y de incubación con el anticuerpo secundario, son específicas para cada proteína a estudiar y se encuentran resumidas en la tabla 8. El revelado empleado para visualizar las proteínas fue la quimioluminiscencia usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en el estudio de Western Blot

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Gal-3	1:1000	Thermo Scientific
Col 1	1:500	Sigma Aldrich
Col 3	1:500	Santa Cruz Biotechnology
α -SMA	1:2000	Sigma Aldrich
Fibronectina	1:1000	Millipore
TGF-β1	1:500	Sigma Aldrich
BMP-2	1:500	Thermo Scientific
BMP-4	1:500	Thermo Scientific
Osteopontina	1:500	Abcam
Runx2	1:500	Sigma Aldrich
Sox-9	1:500	Sigma Aldrich
TNF-α	1:1000	R&D Systems
Cd68	1:500	Abcam
Cd45	1:500	Abcam
Cd80	1:500	Santa Cruz Biotechnology
ERK ½	1:1000	Cell Signaling
ERK 1/2-P (Thr202/Tyr204)	1:1000	Cell Signaling
P38 MAPK	1:1000	Cell Signaling
P38 MAPK-P (Thr180/Tyr182)	1:1000	Cell Signaling
Akt	1:1000	Cell Signaling
Akt-P (Ser473)	1:1000	Cell Signaling
NF-κ B	1:1000	Cell Signaling
NF-κ B-P (Ser536)	1:1000	Cell Signaling
β -Actina	1:2000	Sigma Aldrich

6.5. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD DE METALOPROTEINASAS

La actividad de las MMPs fue estudiada mediante la técnica de zimografía. La zimografía es una técnica electroforética que permite observar la actividad de las enzimas. Dicha técnica se basa en la capacidad de la degradación de colágeno degradado por parte de las MMPs.

Alícuotas de 30 μ l del medio donde las células fueron estimuladas, se separaron mediante el uso de geles de acrilamida. La polimerización de los geles se realizó en presencia de gelatina soluble. De esta manera el gel resultante contiene gelatina (colágeno desnaturalizado). Posteriormente, se preparó un gel superior con una concentración de acrilamida al 4%. Una vez completada la carga en los geles superiores, se sumergió todo el sistema en la solución de electroforesis (Bio-rad) y se aplicó una corriente a un amperaje constante de 50 mA durante una hora y media aproximadamente, creando un campo eléctrico que separó MMPs. Una de las calles del gel se empleó para el marcador de peso molecular conocido.

Durante la electroforesis, el SDS causa la desnaturalización de las MMPs volviéndolas inactivas. Finalizada la electroforesis, el gel es lavado 3 veces de 10 minutos cada una con Triton X-100 al 2,5%, eliminando de esta manera el SDS, renaturalizando y recuperando la actividad de las MMPs. A continuación, los geles se incubaron en un tampón de incubación ((que contiene TRIS, cloruro sódico, cloruro cálcico y tritón, pH=7.5) durante 24 horas a 37°C favoreciendo la digestión de la gelatina por parte de las MMPs. Tras la incubación, el gel se tiñó con Coomassie Blue (BioRad) durante dos horas en agitación a temperatura ambiente. Finalmente los geles se lavaron con agua para retirar el exceso de Coomassie, detectando las bandas blancas en contraste con el fondo azul del sustrato que no había sido degradado.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas se expresaron como media aritmética \pm desviación estándar o mediana (25^o-75^o percentil) y comparadas utilizando la prueba t de Student. Se verificó la normalidad de las distribuciones mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Los coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados para determinar la correlación entre distintas variables. Las variables categóricas se expresaron como porcentajes y comparadas utilizando la prueba χ^2 .

En el estudio humano, se obtuvo un poder estadístico mayor del 80% con una probabilidad menor del 5% de cometer un error tipo II en las diferencias significativas observadas (>0.95 DE).

Los resultados *in vitro* se expresaron como media aritmética \pm error estándar de la media. La normalidad de distribución se verificó por medio de la prueba de Kolmogorov–Smirnov. Los resultados fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA), seguido de un test de Newman-Keuls para evaluar las diferencias específicas.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS versión 20.0 (IBM SPSS Statistics). En todos los casos se consideró que existían diferencias significativas para valores de $p < 0.05$.

Resultados

1. ESTUDIO DE LA COHORTE DE PACIENTES CON EA

1.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES CON EA

Las características básicas de ambos grupos, así como las enfermedades concomitantes y causa de muerte de los sujetos en el grupo control están resumidas en la tabla 9. La edad media del grupo con EA fue de 73 ± 8 años y del grupo control de 76 ± 10 años. El porcentaje de hombres en el grupo con EA fue del 58% y en el grupo control del 55%. De acuerdo con la fisiopatología común de la enfermedad aterosclerótica y la EA degenerativa, un porcentaje importante de pacientes con EA sufrían de enfermedad arterial coronaria e hiperlipidemia concomitante. La mayoría de los pacientes estaba en tratamiento con diuréticos (66%), estatinas (62%) e IECAS (56%). Las variables ecocardiográficas fueron las esperadas en paciente con EA severa, es decir, hipertrofia ventricular izquierda y función ventricular conservada. Los niveles de BNP estaban dentro de límites normales, sugiriendo estadios compensados de la enfermedad.

Ninguno de los controles tenía antecedentes de enfermedad cardiovascular conocida. Las causas de muerte fueron de naturaleza cancerígena (45%) o infecciosa (27%) o en la mayoría de ellos.

1.2. NIVELES DE GAL-3 Y OTROS MARCADORES EN LOS PACIENTES CON EA

Igualmente en la tabla 9 se muestran los niveles de Gal-3, que eran de 17.08 ng/ml. También se muestran los niveles de marcadores inflamatorios (PCR, IL-6, TNF- α) y marcadores de activación leucocitaria (leucocitos, mieloperoxidasa, IL-8, L-selectina), que indican el perfil pro-inflamatorio de los pacientes con EA. Además, en la tabla se muestran los parámetros de función renal (creatinina y TFG).

Tabla 9. Características básicas de ambos grupos

	CONTROLES	PACIENTES CON EA
Edad (años)	76±10	73±8
Hombres	6 (55%)	44 (58%)
Hipertensión	1 (9%)	57 (75%)
Hiperlipidemia	2 (18%)	49 (67%)
Diabetes	1 (9%)	23 (30%)
Enfermedad arterial coronaria	1 (9%)	33 (43%)
Enfermedad pulmonar	4 (36%)	
Causa de muerte:		
Bronconeumonía	3 (27%)	
Sepsis	1 (9%)	
Cancer	5 (45%)	
Traumatismo	1 (9%)	
Edad avanzada	1 (9%)	
Válvulas aórticas bicúspides		33 (43%)
Tratamiento:		
IECAs		42 (55%)
Antagonistas de MR		1 (1%)
β-bloqueantes		21 (28%)
Estatinas		47 (62%)
Diuréticos		50 (66%)
NYHA:		
I	8 (10%)	
II	41 (54%)	
III	24 (31%)	
IV	3 (4%)	
DTDVI (VTDVI/SC)		49 ± 6 mm (27 ± 4 mm/m2)
DTSVI (DTSVI/SC)		32 ± 7 mm (18 ± 4 mm/m2)
VTDVI(VTDVI/SC)		132 ± 49 ml (72 ± 24 ml/m2)
VTSVI (VTSVI/BSA)		51 ± 39 ml (28 ± 20 ml/m2)
Masa VI (Masa VI/SC)		167 ± 58 g (90 ± 25 g/m2)
FEVI (%)		64 ± 14
Gradiente transaórtico máximo		78 ± 21 mmHg
Gradiente transaórtico medio		51 ± 15 mmHg
Área válvula aórtica (AVA/SC)		0.39 ± 0.19 cm2/m2
BNP (pg/mL)		130 (60-263)

Gal-3 (ng/mL)		17.08 ± 5.2
Marcadores de inflamación:		
PCR (mg/L)		2.22 ± 2.04
IL-6 (pg/mL)		9.6 ± 5.6
TNF-α (pg/mL)		31.48 ± 8.86
Leucocitos (109/L)		7.2 ± 2.3
Mieloperoxidasa (pg/mL)		265.49 ± 127.4
IL-8 (pg/mL)		9.51 (5.12-15.25)
L-selectina (pg/mL)		1130.75 ± 309.7
Parámetros renales:		
Creatinina (mg/dL)		0.93 ± 0.25
TFG (mL/min/ m2)		76.8 ± 27

Valores representados como media ± DE o mediana (RIQ). IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina; MR: receptor de mineralocorticoides; NYHA= clasificación de insuficiencia cardiaca de la New York Heart Association; DTDV = diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo, DTSVI = diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo, VTDVI= volumen tele-diastólico del ventrículo izquierdo, VTSVI= volumen tele-sistólico del ventrículo izquierdo. FEVI= fracción de eyección del ventrículo izquierdo, SC= superficie corporal; PCR= proteína C reactiva, IL = interleuquina; TNF-α= factor de necrosis tumoral α; TFG= tasa de filtrado glomerular.

2. ANÁLISIS DE LAS VÁLVULAS AÓRTICAS: ESTUDIO DE LA INFLAMACIÓN, EL REMODELADO Y LA CALCIFICACIÓN

Como se aprecia en la figura 13 se observó una mayor cantidad de componentes de la MEC en las válvulas de los pacientes con EA en comparación con las válvulas control. Los niveles de ARNm de Col1a1, Col3a1, α-SMA, TGF-β y del CTGF, estaban incrementados en las VAs de los pacientes con EA respecto a las válvulas control (*Figura 13A*). La expresión de proteínas de colágeno (tipo I y tipo III), α-SMA, fibronectina y TGF-β, era más alta en las VAs de pacientes con EA que en las de los controles (*Figura 13B*).

Las válvulas con EA presentaban un incremento en niveles de ARNm de MMP-1, MMP-2 y MMP-9, lo que estaba acompañado de un descenso de niveles de ARNm de TIMP-1 sin modificación de los niveles de TIMP-2 (*Figura 13C*). Estos resultados se confirmaron con la técnica de zimografía, que mos-

tró un incremento en la actividad de MMP-1, MMP-2 y MMP-9 en las VAs de pacientes con EA respecto a las VAs control (*Figura 13D*).

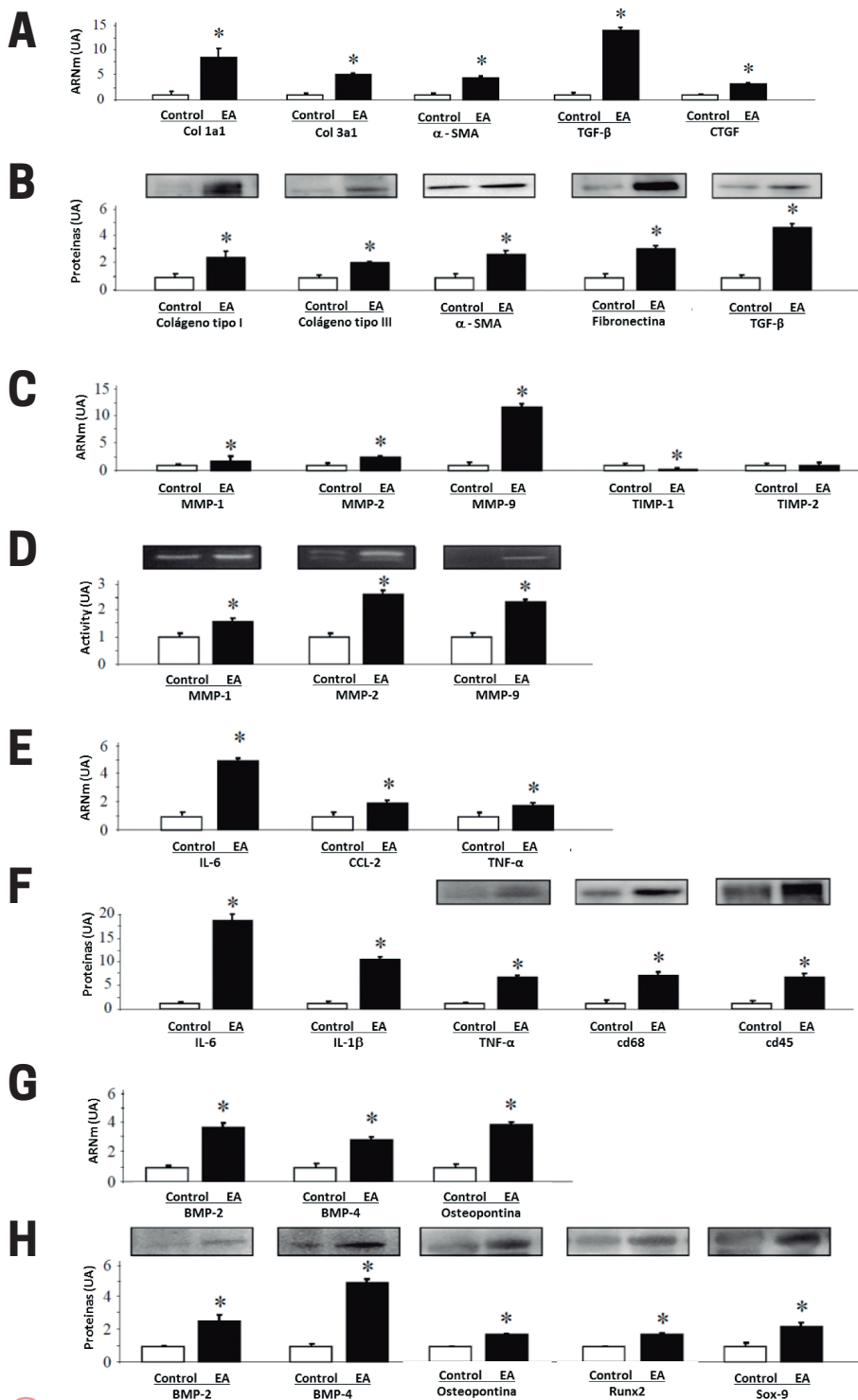
Las VAs de pacientes con EA exhibieron una expresión mayor de marcadores inflamatorios en niveles de ARNm de IL-6, CCL-2, TNF- α (*Figura 13E*) y un incremento a nivel de proteínas de IL-6, IL-1 β , TNF- α , cd68, cd45 en comparación con los controles, sin que se demostraran diferencias en los niveles de cd80 (*Figura 13F*).

Las VAs de pacientes con EA mostraron un incremento en el ARNm de marcadores de calcificación tales como BMP-2, BMP-4 y osteopontina en comparación con las VAs control (*Figura 13G*). A nivel de proteínas, BMP-2, BMP-4, osteopontina, Runx2 y Sox-9 estaban aumentadas en VAs de pacientes con EA en comparación con las VAs control (*Figura 13H*).

Figura 13. Fibrosis, inflamación y calcificación en EA comparada con controles

Componentes de MEC en VAs a nivel de ARNm **(A)** y proteínas **(B)**. Niveles de ARNm de MMPs y sus inhibidores (TIMPs) en VAs **(C)**. Actividad de MMPs en controles y válvulas on EA **(D)**. Marcadores de inflamación fueron medidos en VAs estenóticas y control a nivel de ARNm **(E)** y de proteínas **(F)**. Niveles de ARNm de marcadores de calcificación VAs **(G)** y expresión proteínica de marcadores de calcificación en VAs **(H)**. Todas las condiciones se realizaron por lo menos en triplicado. Las barras de los histogramas representan la media \pm esm de cada grupo de sujetos (control n=11 y pacientes con EA severa n=77) en unidades arbitrarias (UA) normalizadas a HPRT y gel incoloro para ADNc y proteína respectivamente. *P<0.05 respecto al grupo control. EA = estenosis aórtica; VAs = válvulas aórticas; BMP = Proteína morfogénica del hueso; CCL2 = Ligando de quimiocina 2; Col1a1 = cadena de colágeno tipo I alfa1; Col3a1 = cadena de colágeno tipo III alfa 1; CTGF = Factor de crecimiento de tejido conectivo; MEC = matriz extracelular; HPRT = hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa; IL = interleuquina; MMP = Metaloproteinasas de matriz; Runx2 = runt-related transcription factor 2; Sox-9 = SRY (sex-determining region Y)-box 9; α -SMA = actina de músculo liso α ; TGF- β = Factor de crecimiento transformador β ; TIMPS = Inhibidores tisulares de MMPs; TNF- α = Factor de necrosis tumoral-alfa.

Figura 13



3. GAL-3 EN LAS VÁLVULAS AÓRTICAS

3.1. EXPRESIÓN DE GAL-3 EN LAS VÁLVULAS AÓRTICAS

La tinción con hematoxilina/eosina se utilizó para analizar la microestructura de las VAs humanas obtenidas de pacientes sometidos a SVA por EA severa (*Figura 14A*). Como se puede observar en la *Figura 14 B*, la Gal-3 se expresaba de forma espontánea en las VAs de estos pacientes.

Además, se observó un aumento significativo de niveles de proteínas y de ARNm de Gal-3 en las VAs de pacientes con EA en comparación con VAs control. (*Figura 14C*).

3.2. LOCALIZACIÓN DE GAL-3 EN LA VÁLVULA AÓRTICA

La Gal-3 en las VAs se colocó con los marcadores de calcificación BMP-2, Runx2 y Sox-9 (*Figura 14E*) y con los marcadores de inflamación cd68, cd80 y TNF- α (*Figura 14F*).

3.4. ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE GAL-3 EN LA VÁLVULA CON OTROS PARÁMETROS

Se encontró una fuerte correlación positiva entre niveles de proteína de Gal-3 en las VAs y niveles séricos de Gal-3 (*Figura 14D*). Sin embargo, la Gal-3 circulante no se correlacionó con otros parámetros como severidad de la EA, síntomas de insuficiencia cardíaca o BNP sérico. Además, la Gal-3 valvular tampoco se asoció con los parámetros moleculares que caracterizan la fibrosis, inflamación o calcificación valvular.

3.5 ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE GAL-3 CON OTROS PARÁMETROS

Los niveles séricos de Gal-3 estaban positivamente relacionados con los niveles séricos de marcadores inflamatorios como el TNF- α ($r=0.621$, $p<0.001$) e IL-6 ($r=0.521$, $p<0.001$), pero no se demostró correlación con otros parámetros de severidad de la EA o insuficiencia cardíaca.

Figura 14

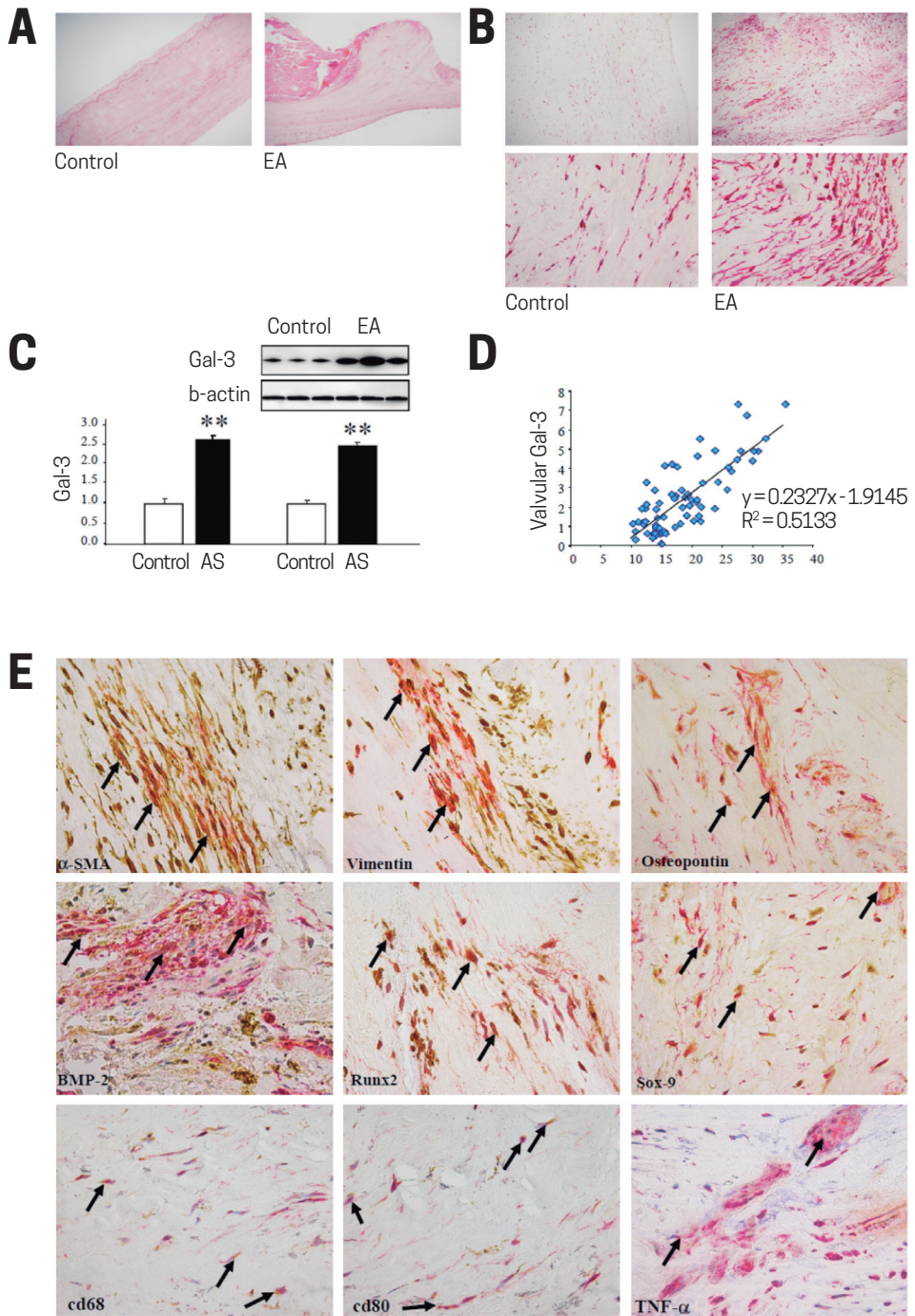


Figura 14. La Gal-3 está asociada con marcadores osteogénicos en pacientes con EA —EN PÁGINA ANTERIOR—

Tinción de hematoxilina/eosina en VAs de pacientes control y con EA **(A)**. Fotografía representativa de una sección de VA de pacientes control y con EA teñidos con Gal-3 a magnificación baja (x10) y alta (x40) **(B)**. Expresión de ARNm y proteína de Gal-3 en VAs de pacientes **(C)** y correlaciones entre los niveles de proteína de Gal-3 valvular y los niveles de Gal-3 en suero **(D)**. Fotografías representativas de secciones de VA teñidas con Gal-3 (rojo), y α -SMA, vimentina, osteopontina, BMP-2, Runx2, Sox-9, cd68, cd80, and TNF- α (marrón). Magnificación x 40 (E). Todas las condiciones se realizaron por lo menos en triplicado. Las barras de los histogramas representan la media \pm esm de cada grupo de sujetos (control n=11 y pacientes con EA severa n=77) en unidades arbitrarias (UA) normalizadas a HPRT y gel incoloro para ADNc y proteína respectivamente. *P<0.05 respecto al grupo control. EA = estenosis aórtica; VAs = válvulas aórticas; BMP = Proteína morfogénica del hueso; HPRT = hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa; Runx2 = runt-related transcription factor 2; Sox-9 = SRY (sex-determining region Y)-box 9; α -SMA = actina de músculo liso α ; TGF- β = Factor de crecimiento transformador β ; TNF- α = Factor de necrosis tumoral-alfa.

4. ESTUDIO IN VITRO EN CIVS

4.1. TRATAMIENTO CON GAL-3

Se trataron CIVs en medio de cultivo normal (DMEM con 0.1% de suero bovino fetal) con Gal-3 (10^{-8} M) durante 1, 2, 3 y 6 días. Tras estos tiempos, se analizaron los marcadores inflamatorios, la síntesis de proteínas de la MEC y los marcadores de calcificación.

El análisis de los marcadores inflamatorios reveló que el tratamiento con Gal-3 aumentó la secreción de IL-6 e IL-1 α en las CIVs (*Figura 15A*).

Además, la Gal-3 aumentó la expresión proteica de Col1, TGF- β y fibronectina de modo tiempo-dependiente (*Figura 15A*).

En cuanto a los marcadores de calcificación, la Gal-3 aumentó la expresión de BMP-2, BMP-4 y SOX-9 de una forma también tiempo-dependiente, alcanzando el pico para los factores a los 6 días de tratamiento. No se apreció modificación de los valores de Runx2 (*Figura 15B*).

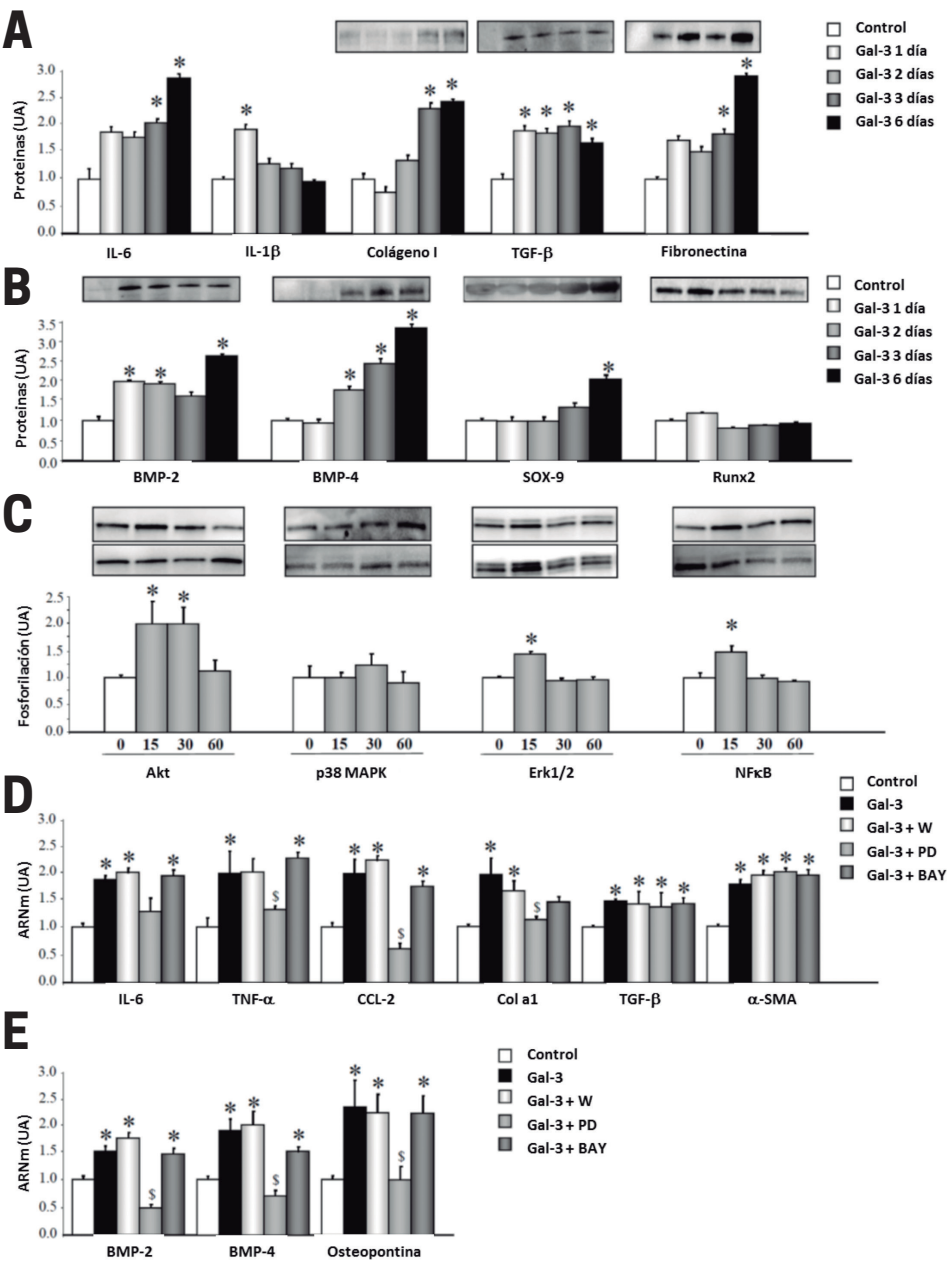
Se analizaron los posibles mecanismos intracelulares por los que la Gal-3 puede ejercer sus efectos pro-inflamatorios, pro-fibróticos y pro-inflamatorios en las CIVs. La Gal-3 indujo la fosforilación de Akt a los 15 y 30 minu-

tos de la estimulación, de ERK1/2 a los 30 minutos de la estimulación y de NFkB a los 15 minutos de la estimulación (*Figura 15C*). La fosforilación de p38 MAPK no cambió tras la incubación con Gal-3 (*Figura 15C*). La presencia de un inhibidor específico de ERK1/2, PD98059, bloqueó el incremento inducido por la Gal-3 en las moléculas inflamatorias, TNF- α y CCL2, así como en la molécula fibrótica, col 1 (*Figura 15D*). Sin embargo, ninguno de los inhibidores probados disminuyó la expresión de TGF- β o α -SMA (*Figura 14D*). El aumento de los marcadores osteogénicos BMP-2, BMP-4, osteopontina, Sox-9 y Runx2 inducido por la Gal-3, fue abolido por el inhibidor de ERK1/2 PD98059 (*Figura 15E*).

Figura 15. La Gal-3 induce inflamación, síntesis de componentes de la MEC y marcadores de calcificación en CIVs —SIGUIENTE PÁGINA—

Efectos de la Gal-3 sobre marcadores inflamatorios, componentes de la MEC (**A**), y marcadores de calcificación (**B**) en CIVs. Efecto de la Gal-3 en la fosforilación de vías intracelulares de CIVs (**C**). Efectos de inhibidores químicos de señalización celular sobre el efecto proinflamatorio y profibrótico de Gal-3 en CIVs (**D**). Efectos de inhibidores químicos de señalización celular sobre el efecto proosteogénico de la Gal-3 en CIVs (**E**). Todas las condiciones se realizaron por lo menos en triplicado. Las barras de los histogramas representan la media \pm esm de 6 estudios en unidades arbitrarias (UA) normalizadas a HPRT y gel incoloro para ADNc y proteína respectivamente. *P<0.05 respecto al grupo control; \$P<0.05 respecto a Gal-3. Akt= proteína quinasa B; BMP= Proteína morfogénica del hueso; CCL2= Ligando de quimiocina 2; Col1a1= cadena de colágeno tipo I alfa1; Col3a1= cadena de colágeno tipo III alfa 1; CTGF = Factor de crecimiento de tejido conectivo; MEC= matriz extracelular; ERK1/2= Quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2; HPRT= hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa; IL= interleuquina; MAPK = Proteína quinasa activada por mitógenos; NFkB= Factor nuclear Kappa B; Runx2= run-related transcription factor 2; Sox-9= SRY (sex-determining region Y)-box 9; α -SMA= actina de músculo liso α ; TGF- β = Factor de crecimiento transformador β ; TNF- α = Factor de necrosis tumoral-alfa.

Figura 15



4.2. INHIBICIÓN DE GAL-3

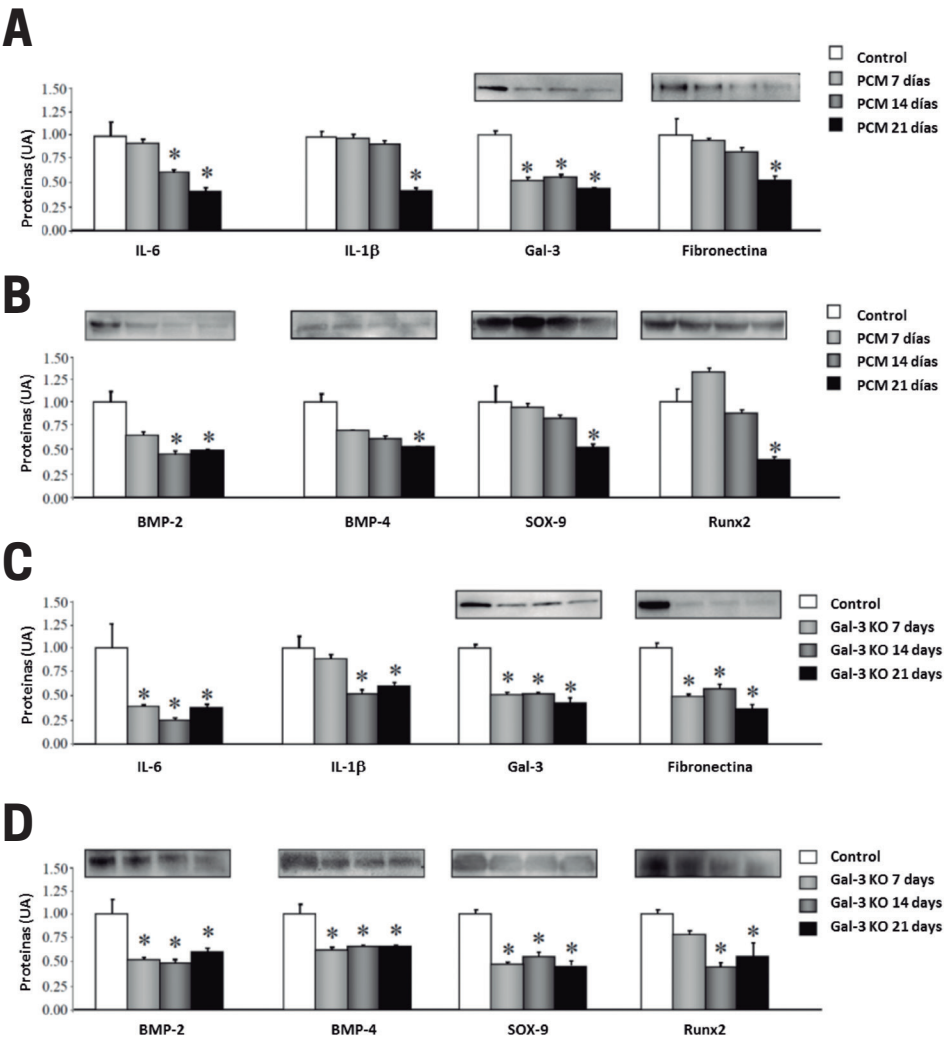
En un primer grupo de experimentos, estudiamos los efectos de MCP, un inhibidor farmacológico de Gal-3, en CIVs cultivadas en un medio pro-osteogénico a diferentes espacios de tiempo (7, 14 y 21 días). La presencia de MCP en el medio de cultivo fue capaz de disminuir no solo la secreción de IL-6 e IL-1 α , sino también los niveles proteicos de Gal-3 en todos los periodos de tiempo evaluados (*Figura 16A*). Esta disminución en Gal-3 se asoció a una disminución en los niveles proteicos de fibronectina a los 21 días de tratamiento con MCP (*Figura 16A*). Además, las CIVs tratadas con MCP presentaron una disminución de los marcadores de calcificación en forma dependiente del tiempo. La MCP disminuyó los niveles proteicos de BMP-2 a los 14 y 21 días de tratamiento y los niveles proteicos de BMP-4, SOX-9 y Runx2 a los 21 día (*Figura 16B*).

Para confirmar los resultados de la inhibición farmacológica de Gal-3, en otro grupo de experimentos se evaluaron los efectos de la inhibición de Gal-3 sobre la diferenciación osteogénica de las CIVs. Para ello, se generaron células que no expresaran Gal-3 con tecnología CRISPR/Cas9. Lo primero comprobamos la eficiencia de la inhibición de la expresión de Gal-3, siendo ésta igual o superior al 50% (*Figura 16C*). En comparación con las control, las CIVs knockout para Gal-3, además de mostrar niveles menores de secreción de IL-6 e IL-1 α , mostraron igualmente una disminución de la expresión proteica de fibronectina en todos los periodos de tiempo estudiados (*Figura 16C*). Además, la expresión de BMP-2, BMP-4, SOX-9 y Runx2 fue inferior en las células knockout para Gal-3 a los días 7, 14 y 21 de diferenciación osteogénica (*Figura 16D*).

Figura 16. La inhibición de Gal-3 reduce inflamación, componentes de la MEC y marcadores de calcificación en CIVs —SIGUIENTE PÁGINA—

Efectos del inhibidor farmacológico de Gal-3, MCP, en inflamación, Gal-3, niveles de proteínas de fibronectina **(A)**, y marcadores de calcificación **(B)** en CIVs cultivadas in medio osteogénico. Efectos del knockout (KO) de Gal-3 en inflamación, Gal-3, niveles de proteína de fibronectina **(C)**, y marcadores de calcificación **(D)** en CIVs cultivadas en medio osteogénico. Todas las condiciones se realizaron por lo menos en triplicado. Las barras de los histogramas representan la media \pm esm de 4 estudios en unidades arbitrarias (UA) normalizadas a HPRT y gel incoloro para ADNc y proteína respectivamente. *P<0.05 respecto al grupo control; BMP= Proteína morfogénica del hueso; ECM, extracellular matrix; IL= interleuquina; MCP= pectina de limón modificada; Runx2= runt-related transcription factor 2; Sox-9= SRY (sex-determining region Y)-box 9.

Figura 16



5. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE GAL-3 EN UN MODELO ANIMAL CON EA

Se trataron ratas que habían desarrollado EA con el inhibidor farmacológico de Gal-3 MCP durante 6 semanas. La expresión valvular de Gal-3 fue mayor en las ratas con sobrecarga de presión (PO) en comparación con las ratas control, y esta se normalizó en las ratas con PO tratadas con MCP (PO+MCP) (*Figura 17A*).

La tinción de hematoxilina/eosina se utilizó para analizar la microestructura de VAs obtenidas de las ratas control, ratas con PO y ratas con PO tratadas con MCP (*Figura 17B*). Como se puede observar en las microfotografías, las VAs de las ratas con PO mostraron mayor área valvular aórtica en comparación con las ratas control y las ratas PO +MCP.

Además, el contenido en colágeno y la expresión del mediador pro-fibrótico TGF- β 1, ambos aumentados en las VAs de ratas con PO, se normalizaron con tratamiento con MCP (*Figura 17C*). En paralelo, la expresión de MMP-2 y MMP-9, también aumentada en las ratas con PO, se normalizó al inhibir farmacológicamente la Gal-3 (*Figura 17D*).

Figura 17. Efecto de la inhibición de Gal-3 en un modelo animal —SIGUIENTE PÁGINA—

Microfotografías representativas de secciones de VA teñidas para Gal-3 **(A)**, hematoxilina/eosina **(B)**, rojo sirio y TGF- β 1 **(C)**, y MMP2 y MMP9 **(D)**. Magnificación 40X. Ratas control, n=7; Ratas con PO, n=7; Ratas con PO y tratadas con MCP, n=7. PO = sobrecarga de presión; TGF- β 1 = Factor de crecimiento transformador β 1; MMP = Metaloproteinasas de matriz; MCP = Pectina modificada de limón.

Los marcadores inflamatorios cd45 y cd68 también aumentaron en las VAs de las ratas PO y se normalizaron con el tratamiento con MCP (*Figura 17A*). Además, la expresión de los marcadores de calcificación BMP-2, BMP-4, Runx2 y SOX-9 (*Figura 17B*), estaba significativamente elevada en las VAs de ratas con PO en comparación con las VAs de las ratas control. EL tratamiento con MCP disminuyó la expresión de todos los marcadores de calcificación analizados (*Figura 17B*).

Figura 17

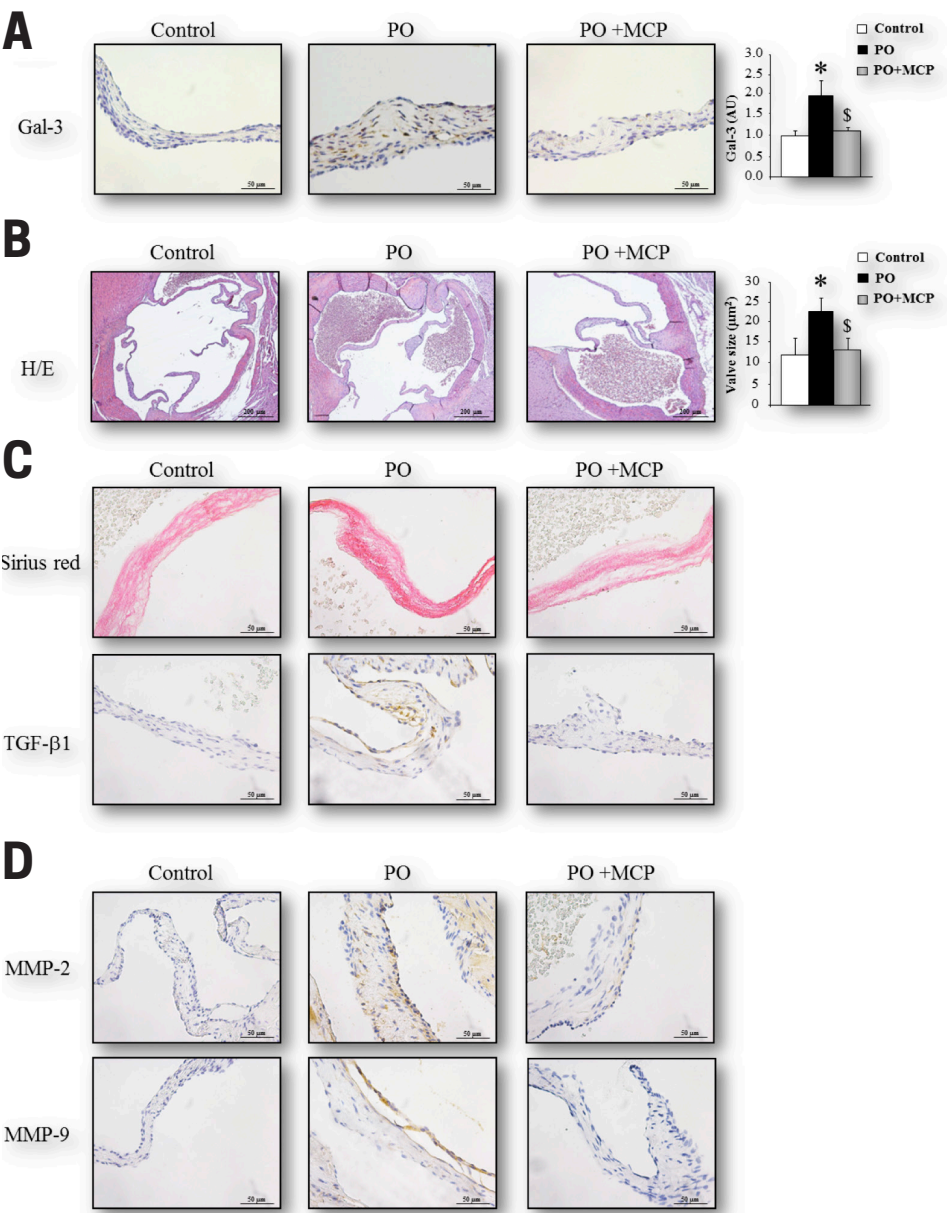
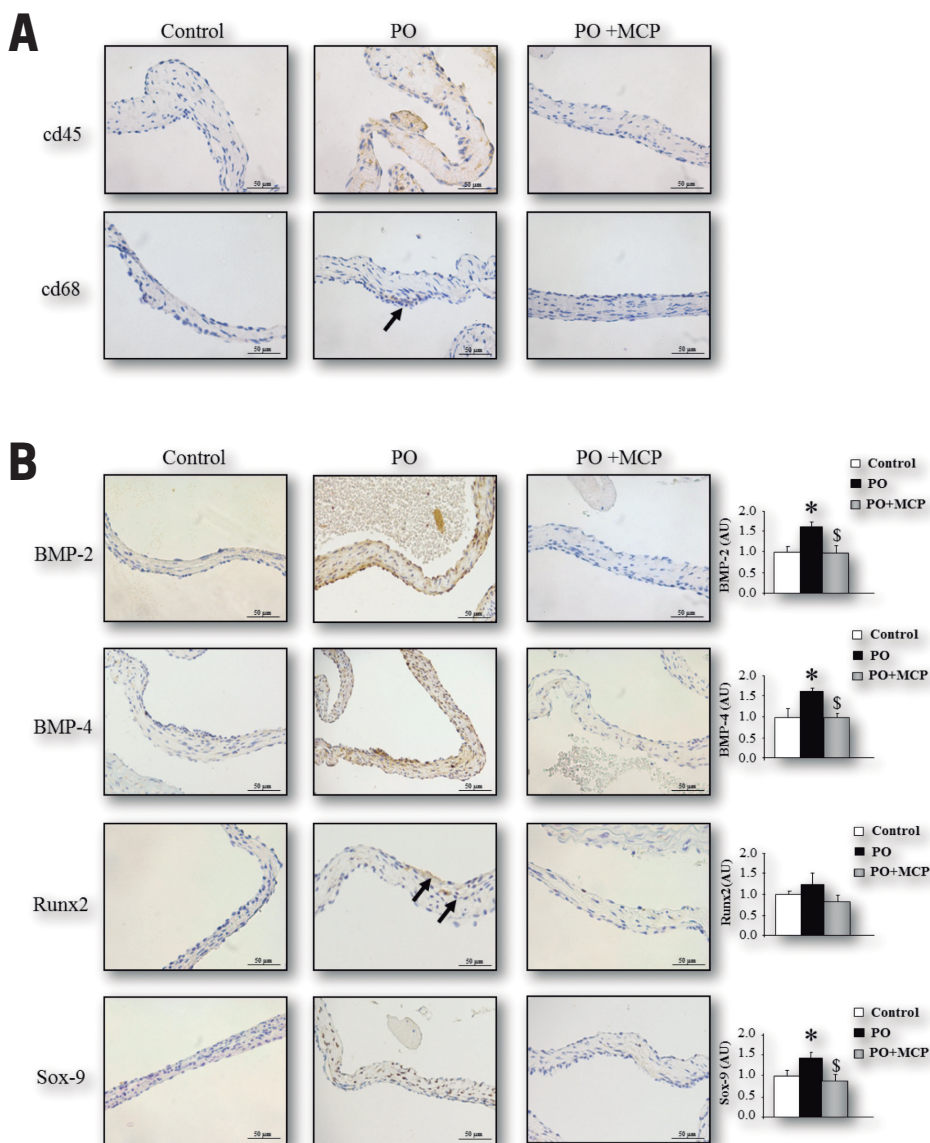


Figura 18**Figura 18. Efecto de la inhibición de Gal-3 en un modelo animal**

Microfotografías representativas de secciones de VA teñidas con los marcadores inflamatorios **(A)**, y de calcificación **(B)**. Magnificación 40X. Ratas control, n=7; Ratas con PO, n=7; Ratas con PO y tratadas con MCP, n=7. PO= sobrecarga de presión; MCP= pectina de limón modificada; Runx2= runt-related transcription factor 2; Sox-9= SRY (sex-determining region Y)-box 9; BMP= Proteína morfogénica del hueso.

Discusión

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio es el de evaluar el papel de la Gal-3 en la calcificación de la VA en pacientes con EA degenerativa. Los resultados demuestran que la Gal-3 está aumentada en el tejido valvular aórtico de pacientes con EA, y que esta elevación se correlaciona con sus niveles séricos. La Gal-3 se colocaliza con marcadores de calcificación e inflamación en VAs con estenosis degenerativa, lo que sugiere que juega un papel en estos procesos. En CIVs aórticas *in vitro*, la Gal-3 es capaz de aumentar la secreción de marcadores de inflamación y fibrosis así como la expresión de mediadores de calcificación. Tanto el MCP, un inhibidor farmacológico de la Gal-3, como el silenciamiento de la Gal-3 mediante el uso de CRISPR/Cas9, retrasa la calcificación en CIVs aórticas. En un modelo *in vivo* de EA, la inhibición farmacológica de la Gal-3 con MCP produce efectos beneficiosos, disminuyendo la calcificación de la VA. Estos hallazgos en su conjunto sugieren que la Gal-3 juega un papel significativo en la calcificación valvular aórtica que se produce en la EA degenerativa.

1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL AUMENTO DE LA GAL-3 EN EL TEJIDO VALVULAR AÓRTICO DE PACIENTES CON EA Y SU ASOCIACIÓN CON SUS NIVELES CIRCULANTES

La EA degenerativa se entiende como un proceso continuo de fibrosis y mineralización de la VA, que reduce progresivamente su movilidad, y que abarca desde la esclerosis aórtica (en la que no hay obstrucción al flujo a través de la VA) hasta la estenosis aórtica calcificada. La EA degenerativa se considera por tanto, una enfermedad fibrocalcificante y se acepta que tanto la esclerosis aórtica como la EA son parte del mismo proceso fisiopatológico (1, 35).

De acuerdo con lo anterior, las válvulas de los pacientes con EA incluidos en nuestro estudio mostraron un aumento en los marcadores de inflamación y calcificación, el remodelado de la MEC, y la actividad de las MMPs. Todos estos procesos se acompañaron de un aumento de los niveles de Gal-3 tanto en el suero como en las válvulas de estos pacientes. Además, se demostró una correlación entre los niveles de proteína Gal-3 en suero y en las VAs, lo que sugiere que los niveles circulantes de Gal-3 pueden reflejar el grado de calcificación de la VA. Por otra parte, la Gal-3 se colocalizó en el tejido de VA con marcadores tanto de CIVs como de inflamación y de osteogénesis, lo cual indica que la Gal-3 está expresada por las CIVs, un tipo celular que juega un papel clave en los procesos de fibrosis y mineralización de la válvula, y que la Gal-3 podría inducir la activación de este tipo celular. Lo anterior hace pen-

sar que esta lectina podría jugar un papel en los procesos inflamatorios y de calcificación valvular asociados a la EA. La Gal-3 se ha asociado con diversos procesos patológicos del sistema cardiovascular, y ha sido estudiada tanto a nivel tisular como plasmático. La Gal-3 modula la diferenciación osteogénica de células musculares lisas vasculares, jugando un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis (90, 147, 148) proceso este que como ya se ha señalado anteriormente, comparte muchas similitudes en cuanto a factores de riesgo y fisiopatología con la EA degenerativa (149, 150). A nivel de grandes vasos, en un modelo experimental de oclusión parcial de aorta ascendente, la expresión de Gal-3 estaba aumentada en la aorta proximal a la oclusión. Este aumento se asoció a un incremento en el grosor de la capa media, y de un aumento en el colágeno total y en la expresión de mediadores fibróticos (151). En pacientes con EA, la expresión de Gal-3 en miocardio está aumentada en aquellos que tienen disfunción ventricular izquierda respecto a los pacientes con función ventricular conservada (122). Asimismo, en biopsias miocárdicas de pacientes con EA, la expresión de Gal-3 en músculo cardíaco está asociada a marcadores de inflamación (152). Estos datos sugerían que la Gal-3 podría jugar un papel en las alteraciones miocárdicas asociadas a la EA. Sin embargo, hasta la realización del presente trabajo, ningún estudio se había centrado en las alteraciones a nivel de la válvula. Nuestros datos sugieren que la Gal-3 juega también un papel en el proceso de calcificación valvular en pacientes con EA degenerativa.

A nivel plasmático, la Gal-3 se ha identificado como un potente marcador independiente de muerte cardiovascular en pacientes con alto riesgo cardiovascular y enfermedad arterial coronaria (153) y de muerte por cualquier causa tras un infarto de miocardio (154). En un estudio poblacional, la Gal-3 se asoció de forma positiva a la velocidad de onda del pulso, un marcador de la rigidez arterial. Estos hallazgos hicieron sugerir a los autores que la Gal-3 puede contribuir a los eventos cardiovasculares adversos, en parte, a través de un efecto sobre la rigidez aórtica (155). Los niveles de Gal-3 están aumentados en pacientes con IC aguda (156) y crónica (94) y la Gal-3 ha propuesto como un marcador de mal pronóstico y de necesidad de reingreso por descompensación hemodinámica en estos pacientes (157, 158). El efecto profibrótico de la Gal-3 en el corazón parece ser el responsable de la asociación entre los niveles plasmáticos de esta y la aparición de fibrilación auricular (159, 160). Respecto a la valvulopatía aórtica, es importante destacar que los niveles elevados de Gal-3 se correlacionan de forma positiva con la fibrosis cardíaca en pacientes con EA (146). Más aun, se ha sugerido que la Gal-3 puede servir como biomarcador pronóstico en pacientes con EA severa tratados con TAVI y valvuloplastia, reflejando su asociación al grado de fibrosis miocárdica en este grupo

de pacientes (144, 145). En contraste a estos hallazgos, el valor pronóstico de la Gal-3 en la EA ha sido puesta en duda en un estudio reciente en el que se incluyeron pacientes con distintos grados de estenosis (leve, moderada y severa) (143). En este estudio nosotros no hemos valorado el valor pronóstico de la Gal-3 en pacientes con EA. Sin embargo, nuestro grupo está llevando a cabo un estudio longitudinal en pacientes con EA severa intervenidos de SVA en el que se valorará el valor predictivo de Gal-3 plasmática previamente a la cirugía en resultados a 12 meses.

A pesar de que el papel de la Gal-3 ha sido objeto de numerosos estudios en distintos procesos fisiopatológicos y clínicos del sistema cardiovascular, su papel en el proceso de la calcificación valvular aórtica en la EA no ha sido bien analizado hasta la fecha. En el presente trabajo, describimos por primera vez que la Gal-3 está aumentada en la VA tanto de pacientes con EA degenerativa, como en un modelo experimental de EA. Ampliamos así los estudios en corazón y aorta a otro órgano diana de la enfermedad cardiovascular, cuya afectación se traduce en importantes consecuencias hemodinámicas que progresan finalmente hasta la IC y la muerte.

2. EFECTO DE LA GAL-3 SOBRE LAS CIVS

La Gal-3 es expresada y liberada por células inflamatorias, incluyendo macrófagos, mastocitos y neutrófilos, que están involucradas en distintos procesos fisiológicos y patológicos (98). La activación e infiltración de macrófagos en el tejido cardíaco está relacionada con el remodelado cardíaco y la patogénesis de la IC (161, 162). La Gal-3 induce la transformación de fibroblastos quiescentes en miofibroblastos activos estimulando la liberación de varios mediadores, como TGF- β e ILs, que dan lugar a la proliferación de miofibroblastos, depósito de colágeno y disfunción ventricular (122) y su inhibición reduce el número de miofibroblastos en un modelo animal de remodelado cardíaco (85). La Gal-3 se expresa de forma espontánea en células de músculo liso vascular y el aumento de esta expresión induce la inflamación y fibrosis arterial inducida por aldosterona (90), y se ha asociado a la fibrosis vascular relacionada con la hipertensión y la edad avanzada (163).

Los velos de la VA son estructuras altamente especializadas que se componen fundamentalmente de CIVs y de estructuras complejas de MEC (72, 164). En la literatura están descritos procesos inflamatorios y fibróticos en VAs tanto animales como humanas (49, 165, 166). Estos eventos están generalmente relacionados con la activación de las CIVs hacia un fenotipo osteogénico, el cual está asociado a una sobre-regulación de las vías de las BMPs (70). Las

MMPs están suprarreguladas en la EA degenerativa, y estas parecen modular el remodelado de la MEC por mediación de mediadores inflamatorios como la IL-1 y la TNF- α (167, 168).

Los resultados del presente trabajo muestran que la Gal-3 ejerce un efecto deletéreo en CIVs humanas, ya que la Gal-3 aumenta marcadores inflamatorios, fibróticos y osteogénicos en VICs activando la vía ERK1/2. Esta vía juega un papel importante en la regulación de la calcificación de CIVs (169), siendo modulada por la activación de Notch 1 (170). Igualmente, se ha demostrado que la Gal-3 tiene propiedades pro-inflamatorias y pro-fibróticas en fibroblastos cardíacos humanos, ya que esta aumenta los marcadores de inflamación, la actividad de las MMPs y los componentes de la MEC (171).

Nuestros resultados demuestran que la Gal-3 no actúa solamente sobre los componentes de la MEC y la inflamación, sino también sobre el proceso de calcificación. *In vitro*, en CIVs humanas, la inhibición de Gal-3 con MCP atenua la respuesta pro-inflamatoria, pro-fibrótica y pro-osteogénica. Además, las CIVs deficientes en Gal-3 presentan menor inflamación y diferenciación osteogénica, indicando que la Gal-3 puede jugar un papel como mediador en la regulación de la calcificación. Este efecto pro-osteogénico de la Gal-3 se confirma en un modelo animal de EA, en el que el tratamiento con el inhibidor farmacológico de la Gal-3 es capaz de disminuir la calcificación de la VA. Es importante destacar que en línea con nuestros hallazgos, se ha visto que la Gal-3 promueve la calcificación vascular asociada a la arteriosclerosis (148). En medios de cultivo que contienen factores inductores de diferenciación osteogénica, las CMLV deficientes en Gal-3, mostraron una diferenciación osteogénica alterada (148), lo que indica que la expresión de Gal-3 es necesaria para una transdiferenciación completa de las CMLVs en un fenotipo osteoblástico (osteoblast-like cells). De hecho, la Gal-3 también ha sido relacionada con Runx2 (172) y con el proceso de formación ósea endocondral. (173).

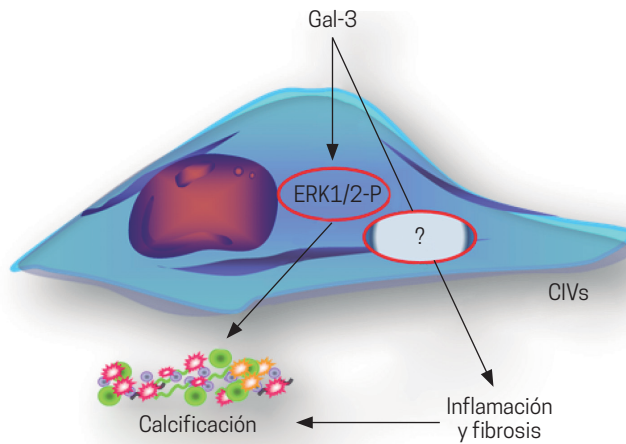
Las cascadas intracelulares que activa la Gal-3 en CIVs son: ERK1/2, Akt y NF κ B, sin encontrar ninguna modificación en el grado de fosforilación de p38MAPK. Sin embargo, nuestros datos muestran sólo que el bloqueo farmacológico de la fosforilación de Erk1/2 es capaz de inhibir la expresión de marcadores de calcificación inducida por la Gal-3. En relación con la vía de Erk 1/2, se ha descrito también como la vía principal implicada en el efecto pro-tumoral de la Gal-3 (174) así como en la migración celular inducida por Gal-3 (85, 175). De hecho, estos datos están en línea con otros hallazgos en CIVs que indican que la activación de la vía ERK1/2 puede ser uno de los mecanismos principales implicados en la calcificación(169).

Curiosamente, el aumento en moléculas pro-inflamatorias y pro-fibróticas inducido por la Gal-3 en CIVs no está mediado por ninguna de las vías intra-

celulares analizadas. Así pues, aunque la activación de las vías de señalización intracelular estudiadas no jueguen un papel en la inflamación y la fibrosis de las CIVs en las condiciones experimentales de nuestro trabajo, no podemos descartar que en una estimulación con Gal-3 más prolongada y por supuesto en modelos *in vivo* estas vías no sean responsables de los efectos pro-inflamatorios y pro-fibróticos de la Gal-3 en CIVs. De hecho, es posible que nuestras condiciones experimentales solo permitan observar los mecanismos de inflamación y

fibrosis más rápidos, mientras que los mecanismos que pasan por otros mediadores requieran tiempos de estimulación más prolongados.

Figura 19
Esquema representativo de los efectos de la Gal-3 en CIVs.



3. INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA GAL-3 COMO POSIBILIDAD TERAPÉUTICA EN LA EA

En la actualidad no existe un tratamiento farmacológico eficaz para prevenir o frenar la progresión de la EA degenerativa. La SVA, mediante cirugía abierta o percutánea en algunos casos, es el único tratamiento que ha demostrado efectividad a largo plazo. Sin embargo, este tratamiento está asociado a un coste considerable, tanto económico como en posible mortalidad y complicaciones, y está generalmente dirigido a estadios avanzados de la enfermedad valvular, con gradientes transvalvulares altos y en muchos casos con datos ya de disfunción ventricular diastólica. En los últimos años, los avances en el conocimiento de la patogénesis de la EA degenerativa ha dejado atrás el concepto de esta enfermedad como un proceso pasivo para considerarlo un proceso activo que involucra varios aspectos como la disfunción endotelial, la acumulación de lípidos, la activación del SRA, el infiltrado inflamatorio y la

calcificación (1). Dado que muchos de estas características se asocian también a la enfermedad aterosclerótica, se han llevado a cabo ensayos clínicos para evaluar si el tratamiento farmacológico (estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) puede prevenir o alterar el curso de la EA degenerativa (176) La EA degenerativa comparte igualmente factores de riesgo con enfermedad cardiovascular. En un estudio reciente sobre más de 1 millón de individuos, se objetivó que la hipertensión arterial, la diabetes y la hiperlipidemia, estaban asociadas de forma dosis-dependiente con la incidencia de EA (177). En los años 90 varios estudios demostraron que el tratamiento hipolipemiente con estatinas (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa) está asociado a una disminución substancial en la incidencia de eventos cardiovasculares (178-180). Dadas las similitudes, tanto en factores de riesgo como en fisiopatología entre la EA degenerativa y la aterosclerosis, surgió la idea de que el tratamiento hipolipemiente podría igualmente prevenir la progresión de la EA. Esta idea ha sido apoyada tanto por estudios *in vitro*, en los que se ha observado un efecto beneficioso de las estatinas sobre las CIVs en el desarrollo de la calcificación valvular (181-183), como por estudios clínicos de naturaleza retrospectiva que sugirieron una asociación entre el tratamiento con estatinas y un enlentecimiento en la progresión de la EA (184-187).

Basados en estos hallazgos, diversos grupos diseñaron ensayos clínicos aleatorizados con grupos control para evaluar el efecto del tratamiento con estatinas en la progresión de la EA degenerativa (ver tabla 10).

Tabla 10 Ensayos clínicos aleatorizados sobre el tratamiento de EA con estatinas

ESTUDIO	AÑO PUBLICADO	NÚMERO DE PACIENTES TRATADOS/ CONTROL	SEGUIMIENTO MEDIO (AÑOS)	EDAD MEDIA (AÑOS)
SALTIRE (188)	2005	77/78	2,1	68
TASS (189)	2008	23/24	2,3	67
SEAS (190)	2008	944/929	4,4	68
ASTRONOMER(191)	2010	134/135	3,5	58

Aunque el tratamiento con estatinas se asoció a una reducción muy significativa de colesterol LDL, en ninguno de estos ensayos se observó diferencias significativas entre el grupo tratado y el control respecto a resultados

clínicos ni a indicadores ecocardiográficos de severidad de la EA (192). Se ha argumentado, que una de las razones para la falta de efecto de las estatinas en este grupo de pacientes, es que el tratamiento se aplicó en fases avanzadas de la enfermedad (34). En un estudio posterior, igualmente prospectivo y aleatorizado con grupo control, pero en pacientes más jóvenes (18-45 años) con estenosis aórtica congénita, el tratamiento con estatinas tampoco tuvo efecto sobre la progresión de la enfermedad (193). Finalmente, los autores de una revisión sistemática de 10 estudios, incluyendo estudios aleatorizados y observacionales, con 3822 pacientes (1608 tratados con estatinas y 2214 sin tratamiento con estatinas), tampoco pudieron demostrar un efecto positivo del tratamiento con estatinas en la progresión o resultados clínicos en pacientes con EA degenerativa (194).

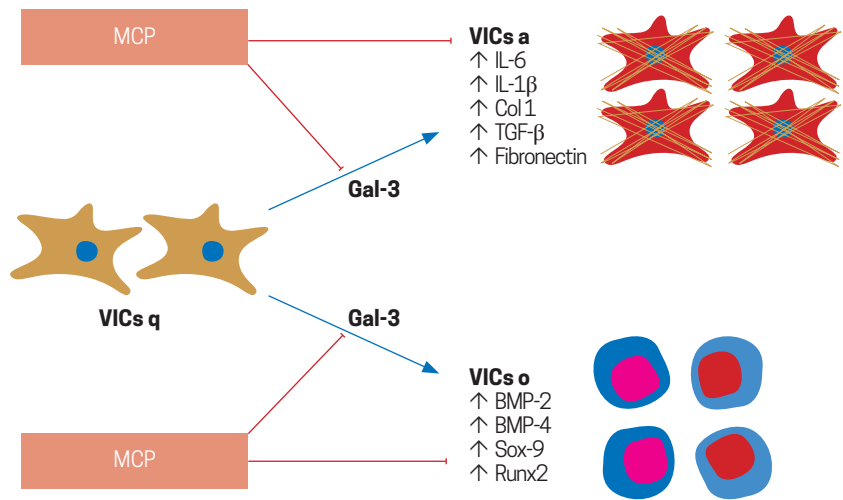
Los pacientes con EA significativa suelen presentar un remodelado del VI en respuesta al incremento crónico de la poscarga. Debido a esto, es concebible que la inhibición del SRA pudiera tener un efecto beneficioso en pacientes con EA(195).

Teniendo en cuenta lo anterior y el hecho de que se ha demostrado que los IECAs reducen la fibrosis ventricular, y la disfunción sistólica y diastólica en pacientes con EA (196) el SRA ha sido evaluado como diana terapéutica para enlentecer el proceso de calcificación de la VA en pacientes con EA degenerativa. En este sentido, dos estudios observacionales mostraron resultados contradictorios. En un análisis retrospectivo de 211 pacientes, el tratamiento con IECAs no retrasó la progresión de la EA (187). Por el contrario, en otro estudio retrospectivo en 123 pacientes con EA evaluados con tomografía computarizada por haz de electrones, el tratamiento con IECAs se asoció con una reducción del 71% en la progresión de la calcificación de la VA (197). Estos hallazgos son difíciles de interpretar dada la naturaleza retrospectiva de los estudios y los amplios intervalos de confianza de los resultados. Recientemente se han publicado los resultados de un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego y con grupo control en 100 pacientes con EA moderada o severa en los que se evaluó el efecto de un IECA (Ramipril). Aparte de observarse una disminución significativa en la regresión de la masa ventricular izquierda en los pacientes tratados con Ramipril, estos también demostraron una tendencia (diferencia no significativa) a una progresión más lenta de la EA en comparación con el grupo control (198). A pesar de que estos resultados y los de otros estudios similares son prometedores, en el momento actual, el uso rutinario de inhibidores del SRA no está sistemáticamente recomendado en el tratamiento de pacientes con EA severa (199).

Estudios realizados previamente por nuestro grupo, han demostrado que la inhibición farmacológica de Gal-3 utilizando MCP, previene el remodelado

cardiovascular tanto en varios modelos hipertensivos (90, 134, 171), como en modelos normotensos de obesidad (105) y EA (200). También nuestro grupo, en el presente trabajo, utilizando un modelo comentado anteriormente de constricción de aorta ascendente (modelo normotenso de aumento de poscarga), ha demostrado el papel beneficioso de la inhibición de Gal-3 con MCP tanto a nivel arterial (sobre el incremento en el grosor de la lámina media aórtica, aumento del colágeno total, y el aumento de la expresión de mediadores fibróticos) como a nivel de la VA (aumento en la inflamación, fibrosis, actividad de la MMPs y marcadores de calcificación) causados por esta (151). Efectos igualmente beneficiosos de la inhibición de Gal-3 se han descrito sobre la fibrosis cardiaca, el remodelado y la disfunción cardiaca en animales tratados con angiotensina-II (85). La N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP), es un tetrapéptico natural que también es capaz de prevenir la inflamación, fibrosis, hipertrofia y disfunción cardiaca inducida por la Gal-3, y que se ha postulado como un posible agente terapéutico en la insuficiencia cardiaca originada por reacciones inflamatorias o inmunológicas como las miocarditis virales o el rechazo cardiaco en el trasplante (123). Con estos antecedentes, nuestro estudio demuestra que la Gal-3 está elevada en las CIVs de válvulas aórticas estenóticas, que la elevación de niveles de Gal-3 juega un papel importante en el aumento de la respuesta pro-inflamatoria, pro-fibrótica y pro-osteogénica, y que su inhibición con MCP retrasa la calcificación de la VA. Teniendo en cuenta la ausencia de un tratamiento farmacológico capaz de revertir o enlentecer el proceso de calcificación, estos nuevos hallazgos obtenidos en VAs estenóticas, en CIVs humanas y en un modelo animal de EA, indican que la Gal-3 puede ser una nueva diana terapéutica para el retraso de la calcificación de la VA en la EA degenerativa. En situaciones de sobrecarga de presión, hay evidencia de depósito aberrante de MEC y fibrosis valvular que contribuyen a la calcificación de la VA (72). El remodelado anormal de la VA también se acompaña de una expresión desregulada de las MMPs e inflamación (201). De acuerdo con estos datos, y en estudios con modelo animal llevados a cabo por nuestro grupo, los sujetos sometidos a sobrecarga de presión (independiente de la presión arterial) presentaron un aumento en inflamación, fibrosis, actividad de MMPs y marcadores de calcificación de la VA. La inhibición farmacológica de Gal-3 con MCP, suprimió o disminuyó estos efectos en ausencia de aumento de la tensión arterial en el grupo de sujetos sometidos a sobrecarga de presión. Estos hallazgos muestran el posible beneficio terapéutico de la inhibición de Gal-3, tanto en el contexto de prevención primaria (en las fases tempranas de sobrecarga de presión) y en la prevención secundaria (una vez instaurada la sobrecarga de presión) (151).

Figura 20
Papel de la Gal-3 en la diferenciación de VICs.



Por último, queda destacar que la Gal-3 tiene efectos en otros órganos y sistemas a parte del cardiovascular. Su mediación en procesos cancerígenos ha sido objeto de múltiples estudios (202, 203). Algunos ejemplos concretos se muestran en la tabla 11. Igualmente juega un papel in procesos inflamatorios y fibróticos a nivel hepático (204) pulmonar (95) y renal (205).

Tabla 11. Ejemplos de mediación de Gal-3 en procesos cancerígenos

	EFFECTO	REFERENCIA
Mama	Protector Promotor	(206) (207)
Colon	Progresión	(208), (209)
Tiroides	Promotor	(210)
Pulmón	Promotor	(211)
Próstata	Promotor	(212), (112)

4. RELEVANCIA CLÍNICA Y PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

Como se ha señalado, la EA degenerativa es una enfermedad relevante desde el punto de vista sanitario por su prevalencia, gravedad y ausencia de tratamiento farmacológico efectivo. La prevalencia de la EA aumentará en el futuro conforme se envejece la población, por lo que es necesario investigar nuevas formas de prevenir y enlentecer el proceso de calcificación valvular una vez que este ha comenzado. En este estudio hemos analizado el papel de la Gal-3 en la calcificación valvular aórtica, que constituye la base fisiopatológica de la EA degenerativa. Aunque la Gal-3 ha sido estudiada previamente en relación a la fibrosis, inflamación y calcificación del sistema cardiovascular, esta es la primera vez que la Gal-3 se estudia en la válvula aórtica. Nuestros hallazgos demuestran que la Gal-3 está implicada en la degeneración calcificante de la VA, y por lo tanto que esta puede tener un papel, primero como biomarcador tanto en el diagnóstico como en la monitorización de la EA degenerativa y segundo, como diana terapéutica en la prevención o tratamiento de esta enfermedad.

Este estudio abre dos grandes perspectivas. Primera, la necesidad de trasladar a estudios animales o humanos el valor diagnóstico y terapéutico de la Gal-3 y de su inhibición. Para ello se necesitarán modelos animales de estenosis aórtica y cohortes significativas de pacientes con EA en estadios iniciales. Segunda, la necesidad de investigar el mecanismo intrínseco por el que la Gal-3 tiene los efectos descritos en este estudio. La proteómica ofrece herramientas para estudiar los sustratos proteicos responsables de los efectos de la Gal-3, y estudios en este sentido son necesarios para continuar con el análisis del papel de la Gal-3 en la EA degenerativa.

5. LIMITACIONES

Hay que tener en cuenta que en la realización de este estudio ha habido diversas limitaciones:

- Controles: autopsias, no enfermedad CV pero... autopsias al fin y al cabo.
- Pacientes tratados. NO hay datos suficientes de score de calcio para analizar posibles asociaciones.
- Pool de tejido valvular para los WB.
- Modelo animal de sobrecarga de presión, no suficiente para ver cambios estructurales.
- Ausencia de pruebas funcionales en modelo animal (hay resonancia pero no se ha estudiado bien la morfología de la VA ni la calcificación).
- CIVs de pacientes (pool 3-5 pacientes y experimentos hechos en 3 sets de VICs, pero bueno, ponlo como limitación).

Conclusiones

1. La Gal-3, una α -galactosidasa que interactúa con receptores celulares de superficie y proteínas de la MEC, está aumentada en el tejido valvular aórtico de pacientes con EA, y esta elevación se correlaciona con sus niveles séricos.
2. La Gal-3 se colocaliza con marcadores de calcificación e inflamación en VAs con estenosis degenerativa, lo que sugiere que juega un papel en estos procesos.
3. En CIVs aórticas *in vitro*, la Gal-3 es capaz de aumentar los marcadores de inflamación, fibrosis, y calcificación.
4. Tanto el MCP, un inhibidor de Gal-3, como el silenciamiento de Gal-3, retrasa la calcificación en CIVs aórticas.
5. En un modelo *in vivo* de EA, la inhibición farmacológica de Gal-3 produce efectos beneficiosos, disminuyendo la calcificación de la VA.
6. Nuestros resultados sugieren que la Gal-3 puede tener un papel, primero como biomarcador tanto en el diagnóstico como en la monitorización de la EA degenerativa y segundo, como diana terapéutica en la prevención o tratamiento de esta enfermedad.

Abreviaturas

α -SMA	Actina de músculo liso α
Ac-SDKP	N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina
aCIVs	Células valvulares intersticiales activadas
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADM A	dimethylarginina asimétrica
AI	Aurícula izquierda
akt	Proteína quinasa B
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Área de sección transversal
AVA	Área valvular aortica
BMP	Proteína morfogénica del hueso
BNP	Péptido natriurético cerebral
Cad-EV	Cadherina endotelial vascular
Col 1	Colageno-1
Col1a1	Colágeno tipo I, cadena alfa 1
Col 3	Colageno 3
Col3a1	Colágeno tipo III, cadena alfa 1
CMLV	Células musculares lisas vasculares
CCL-2	Ligando de quimiocina 2
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
CEVs	Células endoteliales valvulares
CIVs	Células intersticiales valvulares
DTDVI	Diámetro telediastólico
DTSVI	Diámetro telesistólico
EA	Estenosis aórtica
EAC	Enfermedad arterial coronaria
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECG	Electrocardiograma

ABREVIATURAS

EGR-1	Respuesta temprana a crecimiento-1
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
Gal-3	Galectina-3
HDL	Colesterol de alta densidad
IA	Insuficiencia aórtica
FEVI	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
HPRT	hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
IC	Insuficiencia cardiaca
IECA	Enzima inhibidora de angiotensina
IL	Interleuquina
ITV	Integral velocidad -tiempo
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLox	Colesterol LDL oxidado
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MCP	Pectina modificada del limón
MEC	Matriz extracelular
miRs	microARNs
MV	Mímica vasculogénica
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
obCIVs	Células valvulares intersticiales osteoblásticas
MCP	Pectin cítrica modificada
NFκB	Factor nuclear Kappa B
PCR	Proteína C reactiva
pCIVs	Células valvulares intersticiales progenitoras
PET	Tomografía emisora de positrones
PKC	Proteína quinasa C
PO	Sobrecarga de presión

PPVI	Pared posterior de ventrículo izquierdo
PTDVI	Presión teledistólica en el ventrículo izquierdo
qCIVs	Células valvulares intersticiales quiescentes
MR	Receptor mineralocorticoide
RUNX2	Run-related transcription factor 2
SIV	septo interventricular
Sox-9	SRY (sex-determining region Y)-box 9
SRA	Sistema renina angiotensina
SVA	Sustitución valvular aórtica
TAVI	Transcatheter aortic valve implantation
TCMC	Tomografía computarizada multicorte
TEM	Transformación endotelio-mesenquimal
TFG	Tasa de filtrado glomerular
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformador β 1
TIMPs	Inhibidores tisulares de MMPs
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
t-PA	Activador del plasminogeno tisular
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral.
TSVI	Tracto de salida del ventrículo izquierdo
UA	Unidades arbitrarias
VA	Válvula aórtica
VAB	Válvula aórtica bicúspide
VCAM	Células de adhesión celular vasculares
VI	Ventrículo izquierdo
VTDVI	Volumen teledistólico de ventrículo izquierdo
VTSVI	Volumen telesistólico de ventrículo izquierdo

Bibliografía

1. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. *Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update*. *Circulation*. 2011;124(16):1783-91.
2. Yacoub MH, Cohn LH. *Novel approaches to cardiac valve repair: from structure to function: Part I*. *Circulation*. 2004;109(8):942-50.
3. Anderson RH. *The surgical anatomy of the aortic root*. *Multimed Man Cardiothorac Surg*. 2007;2007(102):mmcts.2006.002527.
4. Yener N, Oktar GL, Erer D, Yardimci MM, Yener A. *Bicuspid aortic valve*. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;8(5):264-7.
5. Fedak PW, Verma S, David TE, Leask RL, Weisel RD, Butany J. *Clinical and pathophysiological implications of a bicuspid aortic valve*. *Circulation*. 2002;106(8):900-4.
6. Escudero EM, Pinilla OA. *Paradigmas y paradojas de la hipertrofia ventricular izquierda: desde el laboratorio de investigación a la consulta clínica*. *Archivos de cardiología de México*. 2007;77(3):237-48.
7. Bekeredjian R, Grayburn PA. *Valvular heart disease*. *Circulation*. 2005;112(1):125-34.
8. Lorell BH, Carabello BA. *Left ventricular hypertrophy*. *Circulation*. 2000;102(4):470-9.
9. Hamirani YS, Dietl CA, Voyles W, Peralta M, Begay D, Raizada V. *Acute aortic regurgitation*. *Circulation*. 2012;126(9):1121-6.
10. Lorell BH, Carabello BA. *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis*. *Circulation*. 2000;102(4):470-9.
11. Urso S, Sadaba R, de la Cruz E. *[Asymptomatic severe aortic stenosis: a reopened debate]*. *Med Clin (Barc)*. 2014;142(9):406-11.
12. Evangelista Masip A, Alonso Gómez ÁM, Martín Durán R, Moreno Yagüela M, Ruiz O, María J, et al. *Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en ecocardiografía*. *Revista Española de Cardiología*. 2000;53(05):663-83.
13. Redfors B, Pibarot P, Gillam LD, Burkhoff D, Bax JJ, Lindman BR, et al. *Stress Testing in Asymptomatic Aortic Stenosis*. *Circulation*. 2017;135(20):1956-76.
14. Budoff MJ, Shinbane JS. *Cardiac CT imaging: diagnosis of cardiovascular disease: Springer; 2016*.

15. Shaban N, Sanz J, Frieria LF, García MJ. *Computed Tomography Evaluation in Valvular Heart Disease. Cardiac CT Imaging: Springer; 2016. p. 241-53.*
16. Everett RJ, Newby DE, Jabbour A, Fayad ZA, Dweck MR. *The role of imaging in aortic valve disease. Current cardiovascular imaging reports. 2016;9(7):1-14.*
17. Azevedo CF, Nigri M, Higuchi ML, Pomerantzeff PM, Spina GS, Sampaio RO, et al. *Prognostic significance of myocardial fibrosis quantification by histopathology and magnetic resonance imaging in patients with severe aortic valve disease. Journal of the American College of Cardiology. 2010;56(4):278-87.*
18. Sverdllov AL, Ngo DT, Horowitz JD. *Redefining the natural history of calcific aortic stenosis: lessons from Laennec. J Intern Med. 2012;271(6):569-72.*
19. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Guyton RA, et al. *2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Thorac Cardiovasc Surg. 2014;148(1):e1-e132.*
20. Gohlke-Barwolf C, Minners J, Jander N, Gerdts E, Wachtell K, Ray S, et al. *Natural history of mild and of moderate aortic stenosis-new insights from a large prospective European study. Curr Probl Cardiol. 2013;38(9):365-409.*
21. Ross J, Jr., Braunwald E. *Aortic stenosis. Circulation. 1968;38(1 Suppl):61-7.*
22. Bouma BJ, van Den Brink RB, van Der Meulen JH, Verheul HA, Cheriex EC, Hamer HP, et al. *To operate or not on elderly patients with aortic stenosis: the decision and its consequences. Heart. 1999;82(2):143-8.*
23. Bach DS, Siao D, Girard SE, Duvernoy C, McCallister BD, Jr., Gualano SK. *Evaluation of patients with severe symptomatic aortic stenosis who do not undergo aortic valve replacement: the potential role of subjectively overestimated operative risk. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2009;2(6):533-9.*
24. Barreto-Filho JA, Wang Y, Dodson JA, Desai MM, Sugeng L, Geirsson A, et al. *Trends in aortic valve replacement for elderly patients in the United States, 1999-2011. Jama. 2013;310(19):2078-85.*
25. Bridgewater B, Gummert J, Kinsman R, Walton P. *Towards global benchmarking: the Fourth EACTS adult cardiac surgical database report. Henley-on-Thames: Dendrite Clinical Systems Ltd. 2010.*

26. Fets C-AM. *Mortalidad del bypass aortocoronario por comunidades autónomas: sorpresa aclarada—Los datos administrativos y la calidad*. Cirugía Cardiovascular. 2014;21(4):229-32.
27. Messe SR, Acker MA, Kasner SE, Fanning M, Giovannetti T, Ratcliffe SJ, et al. *Stroke after aortic valve surgery: results from a prospective cohort*. Circulation. 2014;129(22):2253-61.
28. Chan V, Jamieson WR, Germann E, Chan F, Miyagishima RT, Burr LH, et al. *Performance of bioprostheses and mechanical prostheses assessed by composites of valve-related complications to 15 years after aortic valve replacement*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2006;131(6):1267-73.
29. Chiang YP, Chikwe J, Moskowitz AJ, Itagaki S, Adams DH, Egorova NN. *Survival and long-term outcomes following bioprosthetic vs mechanical aortic valve replacement in patients aged 50 to 69 years*. Jama. 2014;312(13):1323-9.
30. Osnabrugge RL, Head SJ, Genders TS, Van Mieghem NM, De Jaegere PP, van der Boon RM, et al. *Costs of transcatheter versus surgical aortic valve replacement in intermediate-risk patients*. Ann Thorac Surg. 2012;94(6):1954-60.
31. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Barwolf C, Levang OW, et al. *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease*. Eur Heart J. 2003;24(13):1231-43.
32. Iung B, Vahanian A. *Epidemiology of valvular heart disease in the adult*. Nat Rev Cardiol. 8. England2011. p. 162-72.
33. Estadística. Id. Gobierno de Navarra; [Available from: <https://www.navarra.es/AppsExt/GN.InstitutoEstadistica.Web/informacionestadistica.aspx?R=1&E=1>].
34. Mathieu P, Boulanger MC. *Basic mechanisms of calcific aortic valve disease*. Can J Cardiol. 2014;30(9):982-93.
35. Luft FC. *Aortic stenosis is largely a boney affair*. J Mol Med (Berl). 2015;93(4):357-9.
36. Boon A, Cheriex E, Lodder J, Kessels F. *Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve*. Heart. 1997;78(5):472-4.
37. Peltier M, Trojette F, Sarano ME, Grigioni F, Slama MA, Tribouilloy CM. *Relation between cardiovascular risk factors and nonrheumatic severe calcific aortic stenosis among patients with a three-cuspid aortic valve*. Am J Cardiol. 2003;91(1):97-9.

38. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol. 1997;29(3):630-4.
39. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. Circulation. 1998;97(18):1837-47.
40. O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. *Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996;16(4):523-32.
41. Cote N, Mahmut A, Bosse Y, Couture C, Page S, Trahan S, et al. *Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease*. Inflammation. 2013;36(3):573-81.
42. Freeman RV, Otto CM. *Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies*. Circulation. 2005;111(24):3316-26.
43. Mahmut A, Boulanger MC, El Hussein D, Fournier D, Bouchareb R, Despres JP, et al. *Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization*. J Am Coll Cardiol. 2014;63(5):460-9.
44. Parolari A, Loardi C, Mussoni L, Cavallotti L, Camera M, Biglioli P, et al. *Nonrheumatic calcific aortic stenosis: an overview from basic science to pharmacological prevention*. Eur J Cardiothorac Surg. 2009;35(3):493-504.
45. Pohle K, Maffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, et al. *Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors*. Circulation. 2001;104(16):1927-32.
46. Yilmaz MB, Guray U, Guray Y, Cihan G, Caldir V, Cay S, et al. *Lipid profile of patients with aortic stenosis might be predictive of rate of progression*. Am Heart J. 2004;147(5):915-8.
47. ten Kate GJ, Bos S, Dedic A, Neefjes LA, Kurata A, Langendonk JG, et al. *Increased Aortic Valve Calcification in Familial Hypercholesterolemia: Prevalence, Extent, and Associated Risk Factors*. J Am Coll Cardiol. 2015;66(24):2687-95.
48. Bosse Y, Miqdad A, Fournier D, Pepin A, Pibarot P, Mathieu P. *Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves*. Circ Cardiovasc Genet. 2009;2(5):489-98.

49. Towler DA. *Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease*. Circ Res. 2013;113(2):198-208.
50. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. *Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology*. Antioxid Redox Signal. 2010;13(1):39-75.
51. Cote C, Pibarot P, Despres JP, Mohty D, Cartier A, Arsenault BJ, et al. *Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis*. Heart. 2008;94(9):1175-80.
52. Mohty D, Pibarot P, Despres JP, Cote C, Arsenault B, Cartier A, et al. *Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28(1):187-93.
53. Satta J, Oiva J, Salo T, Eriksen H, Ohtonen P, Biancari F, et al. *Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis*. Ann Thorac Surg. 2003;76(3):681-8; discussion 8.
54. Cote N, Pibarot P, Pepin A, Fournier D, Audet A, Arsenault B, et al. *Oxidized low-density lipoprotein, angiotensin II and increased waist circumference are associated with valve inflammation in prehypertensive patients with aortic stenosis*. Int J Cardiol. 2010;145(3):444-9.
55. Campbell SE, Katwa LC. *Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts*. J Mol Cell Cardiol. 1997;29(7):1947-58.
56. Fujisaka T, Hoshiga M, Hotchi J, Takeda Y, Jin D, Takai S, et al. *Angiotensin II promotes aortic valve thickening independent of elevated blood pressure in apolipoprotein-E deficient mice*. Atherosclerosis. 2013;226(1):82-7.
57. Parviz Y, Iqbal J, Pitt B, Adlam D, Al-Mohammad A, Zannad F. *Emerging cardiovascular indications of mineralocorticoid receptor antagonists*. Trends Endocrinol Metab. 2015;26(4):201-11.
58. Leopold JA. *Cellular mechanisms of aortic valve calcification*. Circ Cardiovasc Interv. 2012;5(4):605-14.
59. Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA. *The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens*. Circ Res. 2011;109(5):564-77.

60. Chen JH, Yip CY, Sone ED, Simmons CA. *Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential*. Am J Pathol. 2009;174(3):1109-19.
61. Rajamannan NM. *Molecular Biology of Valvular Heart Disease: Springer Science & Business*; 2014.
62. Durbin AD, Gotlieb AI. *Advances towards understanding heart valve response to injury*. Cardiovasc Pathol. 2002;11(2):69-77.
63. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. *The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology*. Am J Pathol. 2007;171(5):1407-18.
64. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. *Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease*. Circ Res. 2004;95(3):253-60.
65. Cushing MC, Liao JT, Anseth KS. *Activation of valvular interstitial cells is mediated by transforming growth factor-beta1 interactions with matrix molecules*. Matrix Biol. 2005;24(6):428-37.
66. Moursi AM, Damsky CH, Lull J, Zimmerman D, Doty SB, Aota S, et al. *Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation*. J Cell Sci. 1996;109 (Pt 6):1369-80.
67. Gould ST, Srigunapalan S, Simmons CA, Anseth KS. *Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease*. Circ Res. 2013;113(2):186-97.
68. El Husseini D, Boulanger MC, Mahmut A, Bouchareb R, Laflamme MH, Fournier D, et al. *P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: implication for calcific aortic valve disease*. J Mol Cell Cardiol. 2014;72:146-56.
69. Mahler GJ, Farrar EJ, Butcher JT. *Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(1):121-30.
70. Poggio P, Sainger R, Branchetti E, Grau JB, Lai EK, Gorman RC, et al. *Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis*. Cardiovasc Res. 2013;98(3):402-10.
71. Sacks MS, David Merryman W, Schmidt DE. *On the biomechanics of heart valve function*. J Biomech. 2009;42(12):1804-24.
72. Back M, Gasser TC, Michel JB, Caligiuri G. *Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases*. Cardiovasc Res. 2013;99(2):232-41.

73. Butcher JT, Nerem RM. *Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007;362(1484):1445-57.
74. Butcher JT, Penrod AM, Garcia AJ, Nerem RM. *Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(8):1429-34.
75. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. *Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves*. Circ Res. 2005;96(7):792-9.
76. Sucosky P, Balachandran K, Elhammali A, Jo H, Yoganathan AP. *Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(2):254-60.
77. Butcher JT, Nerem RM. *Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress*. Tissue Eng. 2006;12(4):905-15.
78. Steadman CD, Ray S, Ng LL, McCann GP. *Natriuretic peptides in common valvular heart disease*. J Am Coll Cardiol. 2010;55(19):2034-48.
79. Small A, Kiss D, Giri J, Anwaruddin S, Siddiqi H, Guerraty M, et al. *Biomarkers of Calcific Aortic Valve Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017;37(4):623-32.
80. Lim P, Monin JL, Monchi M, Garot J, Pasquet A, Hittinger L, et al. *Predictors of outcome in patients with severe aortic stenosis and normal left ventricular function: role of B-type natriuretic peptide*. Eur Heart J. 2004;25(22):2048-53.
81. Bergler-Klein J, Gyongyosi M, Maurer G. *The role of biomarkers in valvular heart disease: focus on natriuretic peptides*. Can J Cardiol. 2014;30(9):1027-34.
82. Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF. *Biomarkers of aortic valve stenosis: Should we rely on a single one?* Rev Port Cardiol. 2016;35(11):579-82.
83. Parenica J, Nemec P, Tomandl J, Ondrasek J, Pavkova-Goldbergova M, Tretina M, et al. *Prognostic utility of biomarkers in predicting of one-year outcomes in patients with aortic stenosis treated with transcatheter or surgical aortic valve implantation*. PLoS One. 2012;7(12):e48851.

84. Yu PJ, Skolnick A, Ferrari G, Heretis K, Mignatti P, Pintucci G, et al. *Correlation between plasma osteopontin levels and aortic valve calcification: potential insights into the pathogenesis of aortic valve calcification and stenosis.* J Thorac Cardiovasc Surg. 2009;138(1):196-9.
85. Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, Bos EM, van Goor H, Sanjabi B, et al. *Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis.* Circ Heart Fail. 2013;6(1):107-17.
86. Navickas R, Gal D, Laucevicius A, Taparauskaite A, Zdanyte M, Holvoet P. *Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review.* Cardiovasc Res. 2016;111(4):322-37.
87. Oury C, Servais L, Bouznad N, Hego A, Nchimi A, Lancellotti P. *MicroRNAs in Valvular Heart Diseases: Potential Role as Markers and Actors of Valvular and Cardiac Remodeling.* Int J Mol Sci. 2016;17(7).
88. Ho MK, Springer TA. *Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies.* J Immunol. 1982;128(3):1221-8.
89. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. *Extracellular functions of galectin-3.* Glycoconj J. 2002;19(7-9):527-35.
90. Calvier L, Miana M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, de Boer RA, et al. *Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(1):67-75.
91. Nishi Y, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikkawa K, et al. *Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis.* Allergol Int. 2007;56(1):57-65.
92. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. *Galectins: structure, function and therapeutic potential.* Expert Rev Mol Med. 2008;10:e17.
93. Lok DJ, Van Der Meer P, de la Porte PW, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, et al. *Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study.* Clin Res Cardiol. 2010;99(5):323-8.
94. Lopez-Andres N, Rossignol P, Iraqi W, Fay R, Nuee J, Ghio S, et al. *Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial.* Eur J Heart Fail. 2012;14(1):74-81.

95. Mackinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T, et al. *Regulation of transforming growth factor-beta1-driven lung fibrosis by galectin-3*. Am J Respir Crit Care Med. 2012;185(5):537-46.
96. Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Masui Y, Yamada D, et al. *Serum levels of galectin-3: possible association with fibrosis, aberrant angiogenesis, and immune activation in patients with systemic sclerosis*. J Rheumatol. 2012;39(3):539-44.
97. Bayes-Genis A, de Antonio M, Vila J, Penafiel J, Galan A, Barallat J, et al. *Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3*. J Am Coll Cardiol. 2014;63(2):158-66.
98. Henderson NC, Sethi T. *The regulation of inflammation by galectin-3*. Immunol Rev. 2009;230(1):160-71.
99. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, et al. *Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3*. J Immunol. 2008;180(4):2650-8.
100. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. *Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages*. J Immunol. 2000;165(4):2156-64.
101. Saccon F, Gatto M, Ghirardello A, Iaccarino L, Punzi L, Doria A. *Role of galectin-3 in autoimmune and non-autoimmune nephropathies*. Autoimmun Rev. 2017;16(1):34-47.
102. Li LC, Li J, Gao J. *Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases*. J Pharmacol Exp Ther. 2014;351(2):336-43.
103. Sato S, Hughes RC. *Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages*. J Biol Chem. 1994;269(6):4424-30.
104. Kasper M, Hughes RC. *Immunocytochemical evidence for a modulation of galectin 3 (Mac-2), a carbohydrate binding protein, in pulmonary fibrosis*. J Pathol. 1996;179(3):309-16.
105. Martinez-Martinez E, Jurado-Lopez R, Valero-Munoz M, Bartolome MV, Ballesteros S, Luaces M, et al. *Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: potential role in obesity*. J Hypertens. 2014;32(5):1104-14; discussion 14.
106. Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, et al. *Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells*. Cancer Res. 2005;65(17):7546-53.

107. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. *Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications.* Am J Pathol. 1995;147(3):815-22.
108. Bresalier RS, Yan PS, Byrd JC, Lotan R, Raz A. *Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system.* Cancer. 1997;80(4):776-87.
109. Riss D, Jin L, Qian X, Bayliss J, Scheithauer BW, Young WF, Jr., et al. *Differential expression of galectin-3 in pituitary tumors.* Cancer Res. 2003;63(9):2251-5.
110. Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, et al. *Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression.* Gastroenterology. 1997;113(6):1906-15.
111. Grosset AA, Labrie M, Vladoiu MC, Yousef EM, Gaboury L, St-Pierre Y. *Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets.* Oncotarget. 2016;7(14):18183-203.
112. Nakajima K, Heilbrun LK, Hogan V, Smith D, Heath E, Raz A. *Positive associations between galectin-3 and PSA levels in prostate cancer patients: a prospective clinical study-I.* Oncotarget. 2016;7(50):82266-72.
113. Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brule F. *Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3.* Oncogene. 2004;23(45):7527-36.
114. de Boer RA, Daniels LB, Maisel AS, Januzzi JL, Jr. *State of the Art: Newer biomarkers in heart failure.* Eur J Heart Fail. 2015;17(6):559-69.
115. Heymans S, Gonzalez A, Pizard A, Papageorgiou AP, Lopez-Andres N, Jaisser F, et al. *Searching for new mechanisms of myocardial fibrosis with diagnostic and/or therapeutic potential.* Eur J Heart Fail. 2015;17(8):764-71.
116. Sharma UC, Mosleh W, Chaudhari MR, Katkar R, Weil B, Evelo C, et al. *Myocardial and Serum Galectin-3 Expression Dynamics Marks Post-Myocardial Infarction Cardiac Remodelling.* Heart Lung Circ. 2017;26(7):736-45.
117. Pugliese G, Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, Menini S. *The dark and bright side of atherosclerotic calcification. Atherosclerosis.* 2015;238(2):220-30.

118. Desmedt V, Desmedt S, Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. *Galectin-3 in Renal Pathology: More Than Just an Innocent Bystander*. Am J Nephrol. 2016;43(5):305-17.
119. Chen SC, Kuo PL. *The Role of Galectin-3 in the Kidneys*. Int J Mol Sci. 2016;17(4):565.
120. Pejnovic N, Jeftic I, Jovicic N, Arsenijevic N, Lukic ML. *Galectin-3 and IL-33/ST2 axis roles and interplay in diet-induced steatohepatitis*. World J Gastroenterol. 2016;22(44):9706-17.
121. Hsieh WC, Mackinnon AC, Lu WY, Jung J, Boulter L, Henderson NC, et al. *Galectin-3 regulates hepatic progenitor cell expansion during liver injury*. Gut. 2015;64(2):312-21.
122. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. *Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction*. Circulation. 2004;110(19):3121-8.
123. Liu YH, D'Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, et al. *N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296(2):H404-12.
124. Qian X, Li M, Wagner MB, Chen G, Song X. *Doxazosin Stimulates Galectin-3 Expression and Collagen Synthesis in HL-1 Cardiomyocytes Independent of Protein Kinase C Pathway*. Front Pharmacol. 2016;7:495.
125. Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. *The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells*. Am J Pathol. 2008;172(2):545-53.
126. Wan SY, Zhang TF, Ding Y. *Galectin-3 enhances proliferation and angiogenesis of endothelial cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells*. Transplant Proc. 2011;43(10):3933-8.
127. Arar C, Gaudin JC, Capron L, Legrand A. *Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells*. FEBS Lett. 1998;430(3):307-11.
128. Papaspyridonos M, McNeill E, de Bono JP, Smith A, Burnand KG, Channon KM, et al. *Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28(3):433-40.

129. Kiwaki K, Novak CM, Hsu DK, Liu FT, Levine JA. *Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue*. Obesity (Silver Spring). 2007;15(1):32-9.
130. Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, et al. *Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin*. J Natl Cancer Inst. 2002;94(24):1854-62.
131. Glinsky VV, Raz A. *Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets*. Carbohydr Res. 2009;344(14):1788-91.
132. Abu-Elsaad NM, Elkashef WF. *Modified citrus pectin stops progression of liver fibrosis by inhibiting galectin-3 and inducing apoptosis of stellate cells*. Can J Physiol Pharmacol. 2016;94(5):554-62.
133. Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, Long DA. *Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury*. PLoS One. 2011;6(4):e18683.
134. Calvier L, Martinez-Martinez E, Miana M, Cachofeiro V, Rousseau E, Sadaba JR, et al. *The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-induced cardiac and renal injuries*. JACC Heart Fail. 2015;3(1):59-67.
135. Ma Z, Han Q, Wang X, Ai Z, Zheng Y. *Galectin-3 Inhibition Is Associated with Neuropathic Pain Attenuation after Peripheral Nerve Injury*. PLoS One. 2016;11(2):e0148792.
136. John CM, Leffler H, Kahl-Knutsson B, Svensson I, Jarvis GA. *Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer*. Clin Cancer Res. 2003;9(6):2374-83.
137. Glinskii OV, Huxley VH, Glinsky GV, Pienta KJ, Raz A, Glinsky VV. *Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs*. Neoplasia. 2005;7(5):522-7.
138. Beuth J, Ko HL, Oette K, Pulverer G, Roszkowski K, Uhlenbruck G. *Inhibition of liver metastasis in mice by blocking hepatocyte lectins with arabinogalactan infusions and D-galactose*. J Cancer Res Clin Oncol. 1987;113(1):51-5.
139. Harrison SA, Marri SR, Chalasani N, Kohli R, Aronstein W, Thompson GA, et al. *Randomised clinical study: GR-MD-02, a galectin-3 inhibitor, vs. placebo in patients having non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis*. Aliment Pharmacol Ther. 2016;44(11-12):1183-98.

140. Oguchi H, Toyokuni T, Dean B, Ito H, Otsuji E, Jones VL, et al. *Effect of lactose derivatives on metastatic potential of B16 melanoma cells*. Cancer Commun. 1990;2(9):311-6.
141. Rajamannan NM, Bonow RO, Rahimtoola SH. *Calcific aortic stenosis: an update*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2007;4(5):254-62.
142. Frank S, Johnson A, Ross J, Jr. *Natural history of valvular aortic stenosis*. Br Heart J. 1973;35(1):41-6.
143. Arangalage D, Nguyen V, Robert T, Melissopoulou M, Mathieu T, Estellat C, et al. *Determinants and prognostic value of Galectin-3 in patients with aortic valve stenosis*. Heart. 2016;102(11):862-8.
144. Baldenhofer G, Zhang K, Spethmann S, Laule M, Eilers B, Leonhardt F, et al. *Galectin-3 predicts short- and long-term outcome in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation (TAVI)*. Int J Cardiol. 2014;177(3):912-7.
145. Bobrowska B, Wieczorek-Surdacka E, Kruszelnicka O, Chyrchel B, Surdacki A, Dudek D. *Clinical Correlates and Prognostic Value of Plasma Galectin-3 Levels in Degenerative Aortic Stenosis: A Single-Center Prospective Study of Patients Referred for Invasive Treatment*. Int J Mol Sci. 2017;18(5).
146. Zhou K, Zhou Y, Zhao Y, Tan C, Yuan Z, Li J, et al. *The Relationship between Galectin-3 and Different Patterns of Ventricular Geometry Remodelling in Aortic Valve Stenosis*. Heart Lung Circ. 2016;25(4):371-7.
147. Nachtigal M, Al-Assaad Z, Mayer EP, Kim K, Monsigny M. *Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions*. Am J Pathol. 1998;152(5):1199-208.
148. Menini S, Iacobini C, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Salvi L, Pesce CM, et al. *The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis*. Cardiovasc Res. 2013;100(3):472-80.
149. Rajamannan NM. *Calcific aortic stenosis: lessons learned from experimental and clinical studies*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(2):162-8.
150. Yetkin E, Waltenberger J. *Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis*. Int J Cardiol. 2009;135(1):4-13.
151. Ibarrola J, Martinez-Martinez E, Sadaba JR, Arrieta V, Garcia-Pena A, Alvarez V, et al. *Beneficial Effects of Galectin-3 Blockade in Vascular and Aortic Valve Alterations in an Experimental Pressure Overload Model*. Int J Mol Sci. 2017;18(8).

152. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. *Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium*. J Am Coll Cardiol. 2012;60(19):1854-63.
153. Maiolino G, Rossitto G, Pedon L, Cesari M, Frigo AC, Azzolini M, et al. *Galectin-3 predicts long-term cardiovascular death in high-risk patients with coronary artery disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35(3):725-32.
154. Lisowska A, Knapp M, Tycinska A, Motybel E, Kaminski K, Swiecki P, et al. *Predictive value of Galectin-3 for the occurrence of coronary artery disease and prognosis after myocardial infarction and its association with carotid IMT values in these patients: A mid-term prospective cohort study*. Atherosclerosis. 2016;246:309-17.
155. Libhaber E, Woodiwiss AJ, Raymond A, Gomes M, Maseko MJ, Sareli P, et al. *Independent associations of circulating galectin-3 concentrations with aortic pulse wave velocity and wave reflection in a community sample*. Hypertension. 2015;65(6):1356-64.
156. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Jr., Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, et al. *Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure*. J Am Coll Cardiol. 2006;48(6):1217-24.
157. French B, Wang L, Ky B, Brandimarto J, Basuray A, Fang JC, et al. *Prognostic Value of Galectin-3 for Adverse Outcomes in Chronic Heart Failure*. J Card Fail. 2016;22(4):256-62.
158. Sudharshan S, Novak E, Hock K, Scott MG, Geltman EM. *Use of Biomarkers to Predict Readmission for Congestive Heart Failure*. Am J Cardiol. 2017;119(3):445-51.
159. Lippi G, Cervellin G, Sanchis-Gomar F. *Galectin-3 in atrial fibrillation: Simple bystander, player or both?* Clin Biochem. 2015;48(12):818-22.
160. Ho JE, Yin X, Levy D, Vasan RS, Magnani JW, Ellinor PT, et al. *Galectin 3 and incident atrial fibrillation in the community*. Am Heart J. 2014;167(5):729-34.e1.
161. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res. 2002;53(1):31-47.
162. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. *Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice*. Am J Pathol. 2007;170(3):818-29.

163. Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM. *Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications*. Can J Cardiol. 2016;32(5):659-68.
164. Merryman WD, Youn I, Lukoff HD, Krueger PM, Guilak F, Hopkins RA, et al. *Correlation between heart valve interstitial cell stiffness and transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;290(1):H224-31.
165. Chakraborty S, Wirrig EE, Hinton RB, Merrill WH, Spicer DB, Yutzey KE. *Twist1 promotes heart valve cell proliferation and extracellular matrix gene expression during development in vivo and is expressed in human diseased aortic valves*. Dev Biol. 2010;347(1):167-79.
166. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Brooks RM, 2nd, Berry CJ, Zimmerman K, et al. *Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice*. Circulation. 2009;119(20):2693-701.
167. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kilic R, Sarikoc A, et al. *Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis*. Atherosclerosis. 2003;170(2):205-11.
168. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kilic R, et al. *Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis*. Cardiovasc Pathol. 2005;14(2):80-7.
169. Gu X, Masters KS. *Role of the MAPK/ERK pathway in valvular interstitial cell calcification*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296(6):H1748-57.
170. Zeng Q, Song R, Ao L, Weyant MJ, Lee J, Xu D, et al. *Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via modulation of ERK1/2 and nuclear factor-kappaB activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(7):1580-90.
171. Martinez-Martinez E, Calvier L, Fernandez-Celis A, Rousseau E, Jurado-Lopez R, Rossoni LV, et al. *Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension*. Hypertension. 2015;66(4):767-75.
172. Stock M, Schafer H, Stricker S, Gross G, Mundlos S, Otto F. *Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2*. J Biol Chem. 2003;278(19):17360-7.

173. Colnot C, Sidhu SS, Poirier F, Balmain N. *Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1999;45(8):1191-202.
174. Mori Y, Akita K, Yashiro M, Sawada T, Hirakawa K, Murata T, et al. *Binding of Galectin-3, a beta-Galactoside-binding Lectin, to MUC1 Protein Enhances Phosphorylation of Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) and Akt, Promoting Tumor Cell Malignancy*. J Biol Chem. 2015;290(43):26125-40.
175. Gao X, Balan V, Tai G, Raz A. *Galectin-3 induces cell migration via a calcium-sensitive MAPK/ERK1/2 pathway*. Oncotarget. 2014;5(8):2077-84.
176. Cawley PJ, Otto CM. *Prevention of calcific aortic valve stenosis-fact or fiction?* Ann Med. 2009;41(2):100-8.
177. Yan AT, Koh M, Chan KK, Guo H, Alter DA, Austin PC, et al. *Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study*. J Am Coll Cardiol. 2017;69(12):1523-32.
178. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. Lancet. 1994;344(8934):1383-9.
179. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al. *Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group*. N Engl J Med. 1995;333(20):1301-7.
180. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. *The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators*. N Engl J Med. 1996;335(14):1001-9.
181. Monzack EL, Gu X, Masters KS. *Efficacy of simvastatin treatment of valvular interstitial cells varies with the extracellular environment*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(2):246-53.
182. Wu B, Elmariah S, Kaplan FS, Cheng G, Mohler ER, 3rd. *Paradoxical effects of statins on aortic valve myofibroblasts and osteoblasts: implications for end-stage valvular heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(3):592-7.
183. Monzack EL, Masters KS. *A time course investigation of the statin paradox among valvular interstitial cell phenotypes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012;303(7):H903-9.

184. Aronow WS, Ahn C, Kronzon I, Goldman ME. *Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons*. Am J Cardiol. 2001;88(6):693-5.
185. Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. *Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis*. Circulation. 2001;104(18):2205-9.
186. Bellamy MF, Pellikka PA, Klarich KW, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M. *Association of cholesterol levels, hydroxymethylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitor treatment, and progression of aortic stenosis in the community*. J Am Coll Cardiol. 2002;40(10):1723-30.
187. Rosenhek R, Rader F, Loho N, Gabriel H, Heger M, Klaar U, et al. *Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis*. Circulation. 2004;110(10):1291-5.
188. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, et al. *A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis*. N Engl J Med. 2005;352(23):2389-97.
189. Dichtl W, Alber HF, Feuchtnner GM, Hintringer F, Reinthaler M, Bartel T, et al. *Prognosis and risk factors in patients with asymptomatic aortic stenosis and their modulation by atorvastatin (20 mg)*. Am J Cardiol. 2008;102(6):743-8.
190. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. *Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis*. N Engl J Med. 2008;359(13):1343-56.
191. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J. *Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial*. Circulation. 2010;121(2):306-14.
192. Teo KK, Corsi DJ, Tam JW, Dumesnil JG, Chan KL. *Lipid lowering on progression of mild to moderate aortic stenosis: meta-analysis of the randomized placebo-controlled clinical trials on 2344 patients*. Can J Cardiol. 2011;27(6):800-8.
193. van der Linde D, Yap SC, van Dijk AP, Budts W, Pieper PG, van der Burgh PH, et al. *Effects of rosuvastatin on progression of stenosis in adult patients with congenital aortic stenosis (PROCAS Trial)*. Am J Cardiol. 2011;108(2):265-71.
194. Parolari A, Tremoli E, Cavallotti L, Trezzi M, Kassem S, Loardi C, et al. *Do statins improve outcomes and delay the progression of non-rheumatic calcific aortic stenosis?* Heart. 2011;97(7):523-9.

195. Davin L, Dulgheru R, Lancellotti P. *ACE inhibitors in aortic stenosis: no fear just hope*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 16. England 2015. p. 828-30.
196. Routledge HC, Townend JN. *ACE inhibition in aortic stenosis: dangerous medicine or golden opportunity?* J Hum Hypertens. 2001;15(10):659-67.
197. O'Brien KD, Probstfield JL, Caulfield MT, Nasir K, Takasu J, Shavelle DM, et al. *Angiotensin-converting enzyme inhibitors and change in aortic valve calcium*. Arch Intern Med. 2005;165(8):858-62.
198. Bull S, Loudon M, Francis JM, Joseph J, Gerry S, Karamitsos TD, et al. *A prospective, double-blind, randomized controlled trial of the angiotensin-converting enzyme inhibitor Ramipril In Aortic Stenosis (RIAS trial)*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2015;16(8):834-41.
199. Andersson C, Abdulla J. *Is the use of renin-angiotensin system inhibitors in patients with aortic valve stenosis safe and of prognostic benefit? A systematic review and meta-analysis*. Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother. 2017;3(1):21-7.
200. Arrieta V, Martinez-Martinez E, Ibarrola J, Alvarez V, Sadaba R, Garcia-Pena A, et al. *A role for galectin-3 in the development of early molecular alterations in short-term aortic stenosis*. Clin Sci (Lond). 2017;131(10):935-49.
201. Vanhoutte D, van Almen GC, Van Aelst LN, Van Cleemput J, Droogne W, Jin Y, et al. *Matricellular proteins and matrix metalloproteinases mark the inflammatory and fibrotic response in human cardiac allograft rejection*. Eur Heart J. 2013;34(25):1930-41.
202. Cardoso AC, Andrade LN, Bustos SO, Chammass R. *Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments*. Front Oncol. 2016;6:127.
203. Wang L, Guo XL. *Molecular regulation of galectin-3 expression and therapeutic implication in cancer progression*. Biomed Pharmacother. 2016;78:165-71.
204. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. *Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(13):5060-5.
205. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, et al. *Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis*. Am J Pathol. 2008;172(2):288-98.

206. Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C, et al. *Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer*. J Pathol. 1996;179(1):43-8.
207. Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H, Raz A. *Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells*. Clin Cancer Res. 2001;7(3):661-8.
208. Schoeppner HL, Raz A, Ho SB, Bresalier RS. *Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon*. Cancer. 1995;75(12):2818-26.
209. Nakamura M, Inufusa H, Adachi T, Aga M, Kurimoto M, Nakatani Y, et al. *Involvement of galectin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis*. Int J Oncol. 1999;15(1):143-8.
210. Trimboli P, Virili C, Romanelli F, Crescenzi A, Giovanella L. *Galectin-3 Performance in Histologic a Cytologic Assessment of Thyroid Nodules: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Int J Mol Sci. 2017;18(8).
211. Chung LY, Tang SJ, Wu YC, Sun GH, Liu HY, Sun KH. *Galectin-3 augments tumor initiating property and tumorigenicity of lung cancer through interaction with beta-catenin*. Oncotarget. 2015;6(7):4936-52.
212. Dondoo TO, Fukumori T, Daizumoto K, Fukawa T, Kohzuki M, Kowada M, et al. *Galectin-3 Is Implicated in Tumor Progression and Resistance to Anti-androgen Drug Through Regulation of Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer*. Anticancer Res. 2017;37(1):125-34.

